

Московский государственный университет имени  
М.В. Ломоносова

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

**Шевелева Анна Александровна**

**Молекулярно-биологические свойства  
российских изолятов вируса оспы сливы**

03.02.02 - Вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук  
Сергей Николаевич Чирков

Москва - 2020

## Содержание

<b>Список сокращений</b> .....	4
<b>Список латинских названий косточковых плодовых культур рода <i>Prunus</i> упомянутых в диссертационной работе</b> .....	5
<b>Список однобуквенных сокращений названий аминокислот</b> .....	6
<b>1. Введение</b> .....	7
<b>2. Обзор литературы</b> .....	14
2.1. Молекулярно-биологические свойства PPV .....	14
2.1.1. Структура PPV.....	14
2.1.2. Функции вирусных белков.....	15
2.1.3. Процесс вирусной инфекции.....	19
2.2. Эпидемиология шарки.....	21
2.2.1. Распространение PPV при вегетативном размножении.....	21
2.2.2. Распространение тлями .....	22
2.2.3. Распространение PPV семенами .....	24
2.2.4. Распространение при механической инокуляции.....	24
2.3. Генетическое разнообразие PPV.....	25
2.3.1. Штамм D .....	25
2.3.2. Штамм M .....	28
2.3.3. Штамм EA .....	29
2.3.4. Штамм C .....	29
2.3.5. Штамм Rec .....	31
2.3.6. Штамм W.....	33
2.3.7. Штамм T .....	34
2.3.8. Штамм An .....	35
2.3.9. Штаммы CR и CV .....	36
2.4. Методы диагностики PPV и определения штамма вирусного изолята .....	37
2.4.1. Диагностика вируса .....	37
2.4.1.1. Биотесты на растениях-индикаторах .....	37
2.4.1.2. Иммунохимические методы .....	38
2.4.1.3. Молекулярные методы диагностики .....	39
2.4.1.4. Метагеномный анализ .....	41
2.4.2. Определение штамма вируса .....	43

<b>3. Материалы и методы</b> .....	46
3.1. Поиск, сбор и хранение образцов .....	46
3.2. Иммуноферментный анализ .....	47
3.3. Получение геномной РНК РРV .....	48
3.4. Получение тотальной РНК .....	48
3.5. Обратная транскрипция .....	60
3.6. Полимеразная цепная реакция .....	60
3.7. Вестерн-блот .....	61
3.8. Определение 3'-концевых последовательностей генома .....	62
3.9. Определение штамма вирусного изолята .....	62
3.10. Секвенирование полных геномов вирусных изолятов .....	63
3.11. Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей .....	64
3.12. Изучение переноса РРV через семена косточковых культур .....	64
3.13. Изучение переноса РРV тлями .....	64
<b>4. Результаты и обсуждение</b> .....	70
4.1. Общая характеристика новых изолятов РРV .....	70
4.2. Характеристика российских изолятов штаммов D, M и Rec .....	71
4.2.1. Штамм D .....	71
4.2.2. Штамм M .....	76
4.2.3. Штамм Rec .....	78
4.3. Штамм W .....	84
4.4. Штаммы РРV, адаптированные к вишне ("вишневые штаммы") .....	95
4.4.1. Штамм CR .....	95
4.4.2. Штамм CV .....	101
4.4.3. Штамм C .....	108
4.4.4. Отличительные особенности вишневых изолятов .....	116
<b>5. Заключение</b> .....	121
<b>6. Выводы</b> .....	125
<b>7. Благодарности</b> .....	126
<b>8. Список литературы</b> .....	127

## Список сокращений

- БО - белок оболочки
- ВИР - Всероссийский институт растениеводства имени Н.И. Вавилова
- ВНИИГСПР - ВНИИ генетики и селекции плодовых растений имени И.В. Мичурина
- ВНИИКР - Всероссийский центр карантина растений
- ГБС - Главный ботанический сад имени Н.В. Цицина РАН
- ИФА – иммуноферментный анализ
- МГУ - Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
- мол. м. - молекулярная масса
- НБС - Никитский ботанический сад - Национальный научный центр РАН
- нт – нуклеотид
- ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
- пн (при цифре) - количество пар нуклеотидов
- РС – рекомбинационное событие
- Татарский НИИСХ - Татарский НИИ сельского хозяйства
- (Сter)N**Ib**-CP-3'-NCR - 3'-терминальный участок генома вируса оспы сливы, включающий полную последовательности гена белка оболочки (CP) и прилегающие последовательности гена N**Ib** и 3'-концевой нетранслируемой последовательности (3'-NCR).
- (Сter)N**Ib**-(Nter)CP - 3'-терминальный участок генома вируса оспы сливы, включающий С-терминальный (3'-концевой) участок гена N**Ib** и N-терминальный (5'-концевой) участок гена белка оболочки (CP).
- (Сter)P3-6K1-(Nter)CI - участок генома вируса оспы сливы, включающий С-терминальный участок гена P3, ген 6K1 и N-терминальный участок гена CI
- DAS-ELISA (double antibody sandwich ELISA) – сэндвич-вариант иммуноферментного анализа
- HTS (high-throughput sequencing) - высокопроизводительное секвенирование
- MilliQ - дистиллированная и деионизированная вода
- PVA (Potato virus A) – вирус А картофеля
- PPV (Plum pox virus) - вирус оспы (шарки) сливы
- PVY (Potato virus Y) - вирус Y картофеля
- TAS-ELISA (triple antibody sandwich ELISA) – не прямой сэндвич-вариант иммуноферментного анализа.

**Список латинских названий косточковых плодовых культур  
рода *Prunus*, упомянутых в диссертационной работе**

*P. armeniaca* L. – абрикос

*P. avium* L. - черешня

*P. cerasifera* Ehrh. - алыча

*P. cerasus* L. - вишня обыкновенная, или кислая

*P. domestica* L. – слива домашняя, или европейская

*P. dulcis* Mill. - миндаль

*P. insititia* L. - тернослива

*P. mahaleb* L. - вишня-антипка

*P. mume* Siebold & Zucc.– абрикос японский

*P. nigra* Aiton - слива канадская

*P. persica* L. (Batsch) - персик

*P. persica* var. *nectarine* - нектарин

*P. salicina* Lindl – слива японская

*P. spinosa* L. - терн

*P. tomentosa* Thunb. - вишня войлочная

## **Список однобуквенных сокращений названий аминокислот.**

A - аланин

C - цистеин

D - аспарагиновая кислота

E - глутаминовая кислота

F - фенилаланин

G - глицин

H - гистидин

I - изолейцин

K - лизин

L - лейцин

M - метионин

N - аспарагин

P - пролин

Q - глутамин

R - аргинин

S - серин

T - треонин

V - валин

W - триптофан

Y - тирозин

## 1. Введение.

### 1.1. Актуальность работы.

Вирус оспы сливы (*Plum pox virus*, PPV, род *Potyvirus*, семейство *Potyviridae*) вызывает у косточковых плодовых культур заболевание, называемое шаркой. Системная вирусная инфекция приводит к поражению хлоропластов, фотосинтетического аппарата и развитию видимых симптомов на листьях, плодах и семенах зараженных растений (Clemente-Moreno et al., 2015) (Рис. 1).

PPV является самым вредоносным вирусным патогеном косточковых, вызывая потери урожая персика, абрикоса, сливы и других экономически значимых культур рода *Prunus* из-за массового (до 100%) опадания плодов, ухудшения их качества и непригодности к переработке. Инфекция может угнетать годовой прирост и сокращает продуктивную жизнь растения. По этим причинам многие зараженные сорта исчезают из обращения, несмотря на высокие агрономические и потребительские качества (Milosevic et al., 2010; Barba et al., 2011; Usenik et al., 2015). Ежегодный ущерб в основных регионах выращивания косточковых культур оценивают в сотни миллионов евро, а количество уничтоженных с 1989 года зараженных деревьев исчисляется миллионами (Cambra et al., 2006a).

В России возделывают несколько основных видов косточковых: вишню обыкновенную, или кислую (*P. cerasus*), сливу (*P. domestica*), абрикос (*P. armeniaca*), персик (*P. persica*), нектарин (*P. persica* var. *nectarine*), черешню (*P. avium*), алычу (*P. cerasifera*), вишню войлочную (*P. tomentosa*), терносливу (*P. insititia*), терн (*P. spinosa*), миндаль (*P. dulcis*). Наибольшую площадь занимают вишня и слива (53 и 42 тыс. га, соответственно). За ними следуют абрикос (12 тыс. га), черешня (11 тыс. га), персик и нектарин (6 тыс. га). Сортоиспытательные участки, питомники и промышленные сады абрикоса, персика, нектарина и черешни сосредоточены главным образом на Северном Кавказе, в Нижнем Поволжье и Крыму. Сливу и вишню возделывают преимущественно в средней полосе России, Поволжье, Предуралье и на Северном Кавказе. Алычу выращивают в Краснодарском крае и в Крыму. Миндаль, терн, тернослива и вишня войлочная не являются в России промышленными культурами, но широко распространены на приусадебных и дачных участках, а также в зеленых насаждениях населенных пунктов («Итоги Всероссийской сельскохозяйственной переписи 2016 года», 2018).

Деревья с типичными симптомами шарки находили в Европейской России в насаждениях косточковых культур и на дикорастущих деревьях (Вердеревская и Маринеску, 1985; Prichodko, 2006; Приходько и соавт., 2008; Приходько и соавт., 2011; Приходько и соавт., 2013; Чирков и Приходько, 2015; Приходько и соавт., 2019). Зараженные деревья могут являться источником дальнейшего распространения вируса. В этой связи сведения о

локализации источников инфекции, генетических вариантах вируса и путях его распространения в насаждениях очень важны для предупреждения проникновения инфекции в новые регионы, оздоровления посадочного материала косточковых культур, снижения потерь урожая, совершенствования методов диагностики РРV.

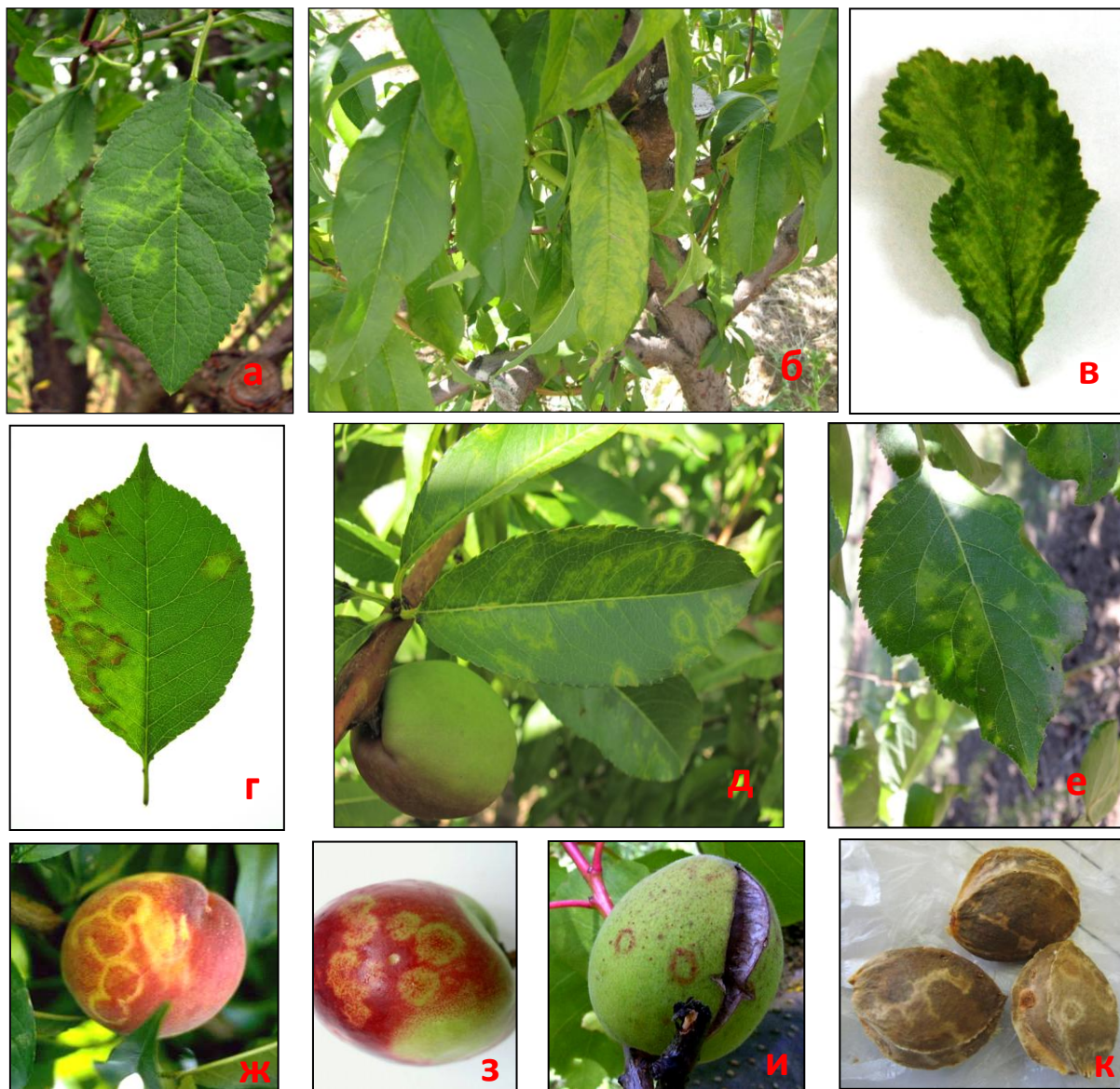


Рис. 1. Симптомы шарки на листьях сливы (а), персика (б), вишни войлочной (в), вишни (г), нектарина (д), абрикоса (е), плодах персика (ж), нектарина (з), сливы (и), косточках абрикоса (к).

Кроме того, РРV относится к обширному семейству *Potyviridae*, многие представители которого являются экономически значимыми патогенами важнейших сельскохозяйственных культур. Изучение молекулярной биологии потивирусов и вызываемых ими инфекций является одной из наиболее динамично развивающихся областей вирусологии растений (Revers & Garcia, 2015). Многие результаты этих исследований получены с использованием



PPV в качестве модельного объекта. Новые российские изоляты PPV могут представлять интерес для дальнейшего изучения потивирусов, их эволюции и молекулярных основ взаимодействия вируса с растением-хозяином.

В силу высокой практической значимости заболевания ("шарки") и широкого использования PPV при изучении фундаментальных аспектов вирусологии растений, исследование молекулярно-биологических свойств российских изолятов этого вируса представляется весьма актуальной задачей.

### **1.2. Степень разработанности темы.**

PPV входит в десятку наиболее изученных вирусов растений (Scholthof et al., 2011). Только в текущем столетии результаты исследований этого вируса были опубликованы в более чем 1300 статьях в журналах, индексируемых в базе данных Web of Science (Rodamilans et al., 2019). В базе данных GenBank депонировано свыше 4600 частичных и полных последовательностей генома изолятов PPV, обнаруженных в различных регионах мира на разных косточковых культурах. Вместе с тем, молекулярно-биологические свойства российских изолятов вируса оставались практически не изученными.

### **1.3. Цель и задачи работы.**

Целью данной работы являлось изучение распространенности и генетического разнообразия PPV в Европейской России и молекулярно-биологическая характеристика выявленных изолятов.

Для достижения этой цели решали следующие задачи:

1) Обследовали насаждения косточковых культур в различных регионах Европейской части России. Собирали образцы листьев с симптомами шарки. Наличие вируса в образце доказывали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

2) Определяли штамм вирусных изолятов методами ИФА со штаммспецифичными моноклональными антелами и ОТ-ПЦР со штаммспецифичными праймерами, а также посредством секвенирования 3'-терминального участка генома.

3) Секвенировали частичные и полные последовательности геномов обнаруженных изолятов и изучали их с помощью биоинформационных методов анализа.

4) Исследовали антигенные и трансмиссивные свойства вирусных изолятов.

### **1.4. Методология и методы исследования.**

Образцы листьев с симптомами вирусной инфекции собирали в течение 2009 - 2018 годов. Для диагностики PPV и определения штамма вирусного изолята использовали сэндвич-вариант ИФА (double antibody sandwich ELISA, DAS-ELISA) и непрямой сэндвич-

вариант ИФА (triple antibody sandwich ELISA, TAS-ELISA) с поликлональными и моноклональными антителами к PPV, соответственно, а также ОТ-ПЦР с универсальными и штаммспецифичными праймерами. Тотальную РНК из листьев растений выделяли с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Германия). Геномную РНК PPV получали из вирусных частиц после их иммуносорбции на поликлональных антителах к вирусу. Продукты ПЦР секвенировали в фирме Евrogen (Россия). Полные последовательности вирусных геномов определяли с помощью высокопроизводительного секвенирования (high-throughput sequencing, HTS) на платформах 454 или Illumina. Прочтения собирали в контиги *de novo* или выравниванием на референсном геноме соответствующего штамма вируса. Полные геномы ряда изолятов штамма W секвенировали в Centre for Plant Health-Sidney Laboratory, Canadian Food Inspection Agency, British Columbia, Канада. Нуклеотидные и предсказанные аминокислотные последовательности выравнивали с помощью программы ClustalW. Филогенетический анализ выполняли с помощью программы MEGA7 (Kumar et al., 2016), а рекомбинационный – программы RDP4 (Martin et al., 2015). Иммунохимические свойства БО изучали с помощью ИФА и Вестерн-блота. Для изучения вертикальной передачи PPV выращивали сеянцы вишни из семян с зараженных деревьев. Для изучения переноса PPV тлями бескрылых особей с зараженных побегов косточковых культур переносили на индикаторные растения и проверяли зараженность последних с помощью ИФА или ОТ-ПЦР.

### **1.5. Научная новизна.**

В насаждениях косточковых культур в Европейской России обнаружены и охарактеризованы 166 новых изолятов PPV. В Ленинградской, Тверской и Владимирской областях, Республике Татарстан, а также в зеленых насаждениях г. Москвы вирус обнаружен впервые.

Открыты два новых штамма вируса – CR (Cherry Russian) и CV (Cherry Volga).

Установлено повсеместное распространение считавшихся редкими штаммов W (PPV-W) и С (PPV-C). Показано, что PPV-W является генетически самым изменчивым штаммом вируса. Доказана возможность переноса изолятов этого штамма чертополоховой тлей *Brachycaudus cardui* и хмелевой тлей *Phorodon humuli*.

Впервые в России и на постсоветском пространстве вообще обнаружены изоляты штамма Res.

Впервые на новых природных хозяевах выявлены изоляты штаммов D, С и W - на вишне войлочной (*P. tomentosa*), и штамма W - на сливе канадской (*P. nigra*).

Секвенированы и депонированы в GenBank 31 полногеномная последовательность новых изолятов PPV и 115 3'-концевых последовательностей различной длины.

В различных участках генома изолятов штаммов W, C и M впервые обнаружены внутриштаммовые рекомбинационные события. В 5'-концевом участке генома изолятов штаммов C и Res обнаружены новые междуштаммовые рекомбинационные события.

Выявлены присутствие и высокая частота мутации D96E в универсальном эпитопе белка оболочки (БО) изолятов штаммов C и CR, адаптированных к вишне. Показано, что изоляты с такой мутацией не распознаются моноклональными антителами 5B, специфичными к универсальному эпитопу, что может затруднять иммунохимическую диагностику PPV в образцах вишни.

Тестирование моноклональных антител 4A11 на широкой панели российских изолятов PPV-W методом TAS-ELISA показало возможность их применения в качестве штаммспецифичных антител для идентификации изолятов штамма W. Анализ природных мутаций в N-конце БО изолятов штамма D позволил уточнить последовательность эпитопа, распознаваемого штаммспецифичными моноклональными антителами 4DG5.

В ряде вирусных белков изолятов штаммов C, CR и CV идентифицированы аминокислотные остатки, специфичные для изолятов PPV, адаптированных к вишне. Возможно, некоторые из них являются детерминантами, определяющими круг хозяев вируса.

Впервые в качестве стартового материала для синтеза библиотек кДНК для HTS использована геномная РНК PPV, что позволило повысить долю вирусспецифических последовательностей в кДНК.

### **1.6. Теоретическая и практическая значимость работы.**

Результаты исследования существенно расширяют представления о генетическом разнообразии PPV, его ареале, круге хозяев и эволюционной истории.

Практическая значимость работы заключается в том, что на основе изучения распространенности и штаммового разнообразия PPV в различных типах насаждений косточковых культур становится возможной оценка текущей эпидемиологической ситуации в Европейской России и ее прогноз с учетом современных тенденций в развитии плодоводства. Результаты работы могут способствовать совершенствованию методов диагностики PPV, разработке фитосанитарных мер для ограничения дальнейшего распространения вируса и быть использованы в селекционной и биотехнологической работе для создания толерантных и устойчивых к шарке сортов косточковых культур.

### **1.7. Степень достоверности и апробация результатов.**

Диагностику PPV и идентификацию штаммов проводили, используя современные общепринятые методы, средства и протоколы анализа. Результаты иммунохимического и молекулярного анализа вирусных изолятов совпадали. Последовательности вирусных

геномов, определенные независимо и разными методами, были идентичны. Биоинформационную обработку данных проводили с помощью известных, многократно апробированных программ.

Результаты работы были доложены на: International Symposium on Plum pox virus «Century of Plum pox virus research» (София, Болгария, 2010), VII Международной научной конференции Украинского общества генетиков и селекционеров имени Н.И. Вавилова "Факторы экспериментальной эволюции организмов" (Алушта, Украина, 2011), Международной конференции «Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры», посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной Академии наук Беларуси (Минск, Беларусь, 2012), Международной научной конференции «Дендрология, цветоводство и садово-парковое строительство», посвященной 200-летию Никитского ботанического сада (Ялта, Украина, 2012), 22nd International Conference on Virus and other Transmissible Diseases of Fruit Crops (Рим, Италия, 2012), 2nd International Symposium on Plum Pox Virus (Оломоуц, Чехия, 2013), VIII Международной научной конференции Украинского общества генетиков и селекционеров имени Н.И. Вавилова "Факторы экспериментальной эволюции организмов" (Алушта, Украина, 2013), 23th International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops (Мориока, Япония, 2015), XVIII International Plant Protection Congress (Берлин, Германия, 2015), 3rd International Symposium on Plum pox virus (Анталья, Турция, 2016), 24th International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops (Салоники, Греция, 2017), VIII Международной научно-практической конференции "Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)"(Ялта, Россия, 2018).

#### **1.8. Положения, выносимые на защиту.**

1) В Европейской части России существует обширная природная популяция PPV. Вирус обнаружен на севере и в средней полосе Европейской России, Среднем Поволжье, Крыму, на Северном Кавказе в сортовых и ботанических коллекциях, на сортоиспытательных участках, в плодоносящих и заброшенных садах, на дачных участках и дикорастущих деревьях на основных косточковых культурах.

2) На вишне обыкновенной (*Prunus cerasus*) открыты два новых штамма вируса: CR (Cherry Russian) и CV (Cherry Volga).

3) Популяция PPV в Европейской России представлена штаммами D, M, Res, преобладающими в зарубежной Европе, и штаммами W, C, CR и CV, которые практически не встречаются за пределами бывшего СССР (W, C) или обнаружены только в России (CR,

CV). По-видимому, штаммы W, C, CR и CV являются автохтонными, а штаммы D, M и Rec могли быть интродуцированы в Россию с европейскими сортами косточковых культур.

4) На новых природных хозяевах выявлены изоляты штаммов D, C и W на войлочной вишне (*Prunus tomentosa*) и штамма W на сливе канадской (*Prunus nigra*).

5) Штамм W является генетически самым изменчивым среди известных штаммов PPV.

6) Геномы многих изолятов штаммов M, W, Rec и C являются рекомбинантными. Впервые выявлены внутриштаммовые рекомбинационные события среди изолятов штаммов M, W и C. Обнаружены новые междуштаммовые рекомбинационные события в геномах изолятов штаммов Rec и C.

7) В универсальном эпитопе БО штаммов C и CR широко распространена мутация D96E. Изоляты с такой мутацией не распознаются моноклональными антителами 5B, что может затруднять иммунохимическую диагностику PPV в вишне и черешне.

8) Белок оболочки изолятов штаммов W, C, CR и CV обладает аномально низкой электрофоретической подвижностью, возможно, вследствие гликозилирования N-конца молекулы.

## 2. Обзор литературы

Симптомы шарки впервые наблюдали на сливе в 1915 – 1916 годах в Болгарии. Вирусная этиология заболевания была доказана Атанасовым. Им же предложено название болезни, одним словом описывающее характерные симптомы на листьях и плодах сливы: «шарка» по-болгарски означает «оспа», «узор», «рисунок» (Atanasoff, 1932). Возможно, PPV был впервые обнаружен на Балканах не вполне случайно. Мультипараметрический анализ всех доступных полногеномных последовательностей этого вируса (206 на начало 2019 года) и структуры его мировой популяции показал, что центром происхождения PPV является, по видимому, Восточная или Центральная Европа, где его предшественник появился незадолго до начала новой эры (Hajizadeh et al., 2019). В настоящее время вирус находят на косточковых культурах по всему миру (за исключением Австралии, Новой Зеландии и Южной Африки), куда он распространился в результате ввоза зараженных черенков, саженцев или пробирочных растений (Barba et al., 2011; Garcia et al., 2014; Rimbaud et al., 2015a).

### 2.1. Молекулярно-биологические свойства PPV.

Наряду с *Potato virus Y* (PVY, типовым представителем рода *Potyvirus*), PPV является самым изученным представителем этого рода и входит в десятку наиболее изученных вирусов растений (Scholthof et al., 2011). Хотя многие сведения по молекулярной биологии потивирусов были получены при исследовании других представителей этого рода, они считаются приложимыми и к PPV в силу большого сходства процессов трансляции геномной РНК, репликации вирусного генома, межклеточного и сосудистого транспорта вируса по растению.

#### 2.1.1. Структура PPV.

Вирионы представляют собой нитевидные частицы длиной 750 нм и диаметром 15 нм, которые состоят из одной молекулы РНК положительной полярности размером от 9786 до 9795 нуклеотидов (нт) и примерно 2 тыс. молекул БО с молекулярной массой (мол. м.) около 36,6 кДа, рассчитанной по аминокислотному составу. Встречаются укороченные формы геномной РНК вследствие делеций протяженностью от 2 до 45 триплетов в N-конце гена БО у изолятов NAT (D13751) (Maiss et al., 1989), KZPLa1 (AY591253) (Spigel et al., 2004), B1298 (AM184114) (Szathmary et al., 2008), Godollo2 (FN179153). Геномная РНК бицистронна, содержит 5'- и 3'-нетранслируемые области (non-coding regions, NCR) длиной, соответственно, 146 и 217 нт, вирусный белок VPg, ковалентно связанный с 5'-концом РНК, и поли-А-последовательность на 3'-конце (Рис. 2). РНК транслируется с образованием полипротеина, который котрансляционно нарезается вирусными протеазами P1, HCPro и

NIaPro на 10 функционально активных белков: P1, HCPro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa, NIb, CP (белок оболочки, БО), хотя многие белки в норме функционируют в составе частично процессированных интермедиатов. Участок связывания протеаз охватывает шесть аминокислотных остатков до сайта разрезания (считая от N-конца полипротеина) и один аминокислотный остаток после этого сайта. Типичные последовательности сайтов протеолиза потивирусов, включая PPV, охарактеризованы в обзоре Adams et al. (2005) на основе выравнивания полипротеинов 30 различных потивирусов. Короткая перекрывающаяся рамка считывания (Pretty Interesting *Potyviridae* ORF, PIPO) (Chung et al., 2008) возникает в результате сдвига в основной рамке считывания из-за проскальзывания (с частотой около 1.6%) вирусной репликазы на мотиве GA<sub>6</sub> в середине гена P3, и транслируется как P3N-PIPO фьюжен-продукт (Rodamilans et al., 2015).

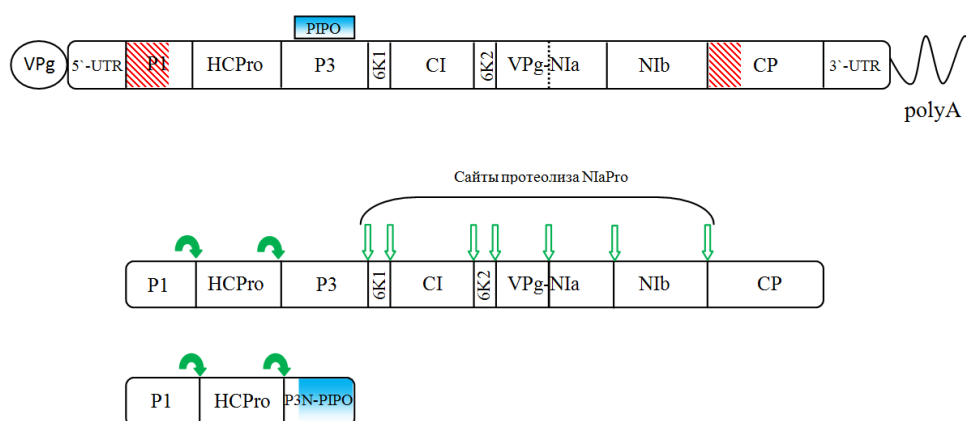


Рис. 2. Структура генома и полипротеина PPV. Косая штриховка показывает самые переменные участки генома. Стрелки указывают на сайты протеолиза полипротеина.

### 2.1.2. Функции вирусных белков.

Функции белков потивирусов и, в частности, PPV, подробно описаны в ряде недавних обзоров (Salvador et al., 2006; Ivanov et al., 2014; Revers & Garcia, 2015; Rodamilans et al., 2019).

Белок P1 (protein 1) является сериновой протеиназой, способной автокаталитически отщепляться от полипротеина. Консервативный протеазный домен локализован на С-конце молекулы белка. Неупорядоченный N-концевой участок отличается высоким уровнем изменчивости среди потивирусов по размеру и аминокислотной последовательности. P1 играет важную роль в репликации генома, проявлении симптомов вирусной инфекции и в адаптации к растению-хозяину. Для отщепления от полипротеина P1 PPV нуждается в неидентифицированном пока факторе растения-хозяина. В его отсутствие отщепления не происходит, антисайлесинговая активность HCPro (см. ниже) не проявляется, и, в силу этого,

системная инфекция не развивается. Таким образом, наличие или отсутствие такого хозяйского фактора (или несовместимость с ним белка P1) может влиять на круг хозяев PPV (Shan et al., 2018). P1 потивирусов – щелочной белок и способен связываться с нуклеиновыми кислотами *in vitro*, однако неизвестно, имеет ли это свойство какое-либо функциональное значение.

Белок HCPro (helper component protease) является цистеиновой протеиназой и, подобно P1, способен автокаталитически отщепляться от полипротеина. Белок состоит из трех структурных доменов – N- и C-концевых участков длиной примерно 100 аминокислотных остатков каждый и сердцевины молекулы длиной около 250 аминокислотных остатков. Протеазная активность связана с C-концом HCPro. Расположенные в N-конце аминокислотные мотивы РТК и КИТС взаимодействуют, соответственно, с мотивом DAG БО вируса и внутренней поверхностью стилета тля, формируя молекулярный мост и обеспечивая перенос вируса тлями. Большая часть других функций HCPro опосредована его коровым доменом и реализуется в составе димера или олигомеров этого белка. HCPro находится в цитоплазме зараженных клеток в виде растворимого димера или аморфных агрегатов. Олигомеризация происходит с участием C-конца молекулы (Plisson et al., 2003). HCPro может являться структурным компонентом вириона, локализованным на конце вирусной частицы вблизи белка VPg (Torrance et al., 2006). Важнейшей функцией HCPro является противодействие защитным реакциям растения на вирусную инфекцию путем супрессии РНК-сайлесинга. Мутанты, которые экспрессируют HCPro без антисайлесинговой активности, нежизнеспособны в растениях дикого типа, но могут заражать растения, дефектные по РНК-сайлесингу. Считается, что эта функция HCPro реализуется посредством связывания малых РНК, таргетирующих геномную РНК вируса с ее последующей фрагментацией. Однако поскольку мутанты HCPro по РНК-связывающему сайту (мотиву FRNK) тоже обладают антисайлесинговой активностью, обсуждаются альтернативные механизмы супрессии сайлесинга, основанные на взаимодействии HCPro с клеточными белками, такими как фактор транскрипции RAV2, кальмодулин-подобный белок rgs-CaM и белок HEN1, который блокирует метилирование малых РНК *in vivo*. Кроме того, HCPro необходим для репликации и системного транспорта вируса, а также является одним из основных вирусных белков, модулирующих симптомы вирусной инфекции.

P3 (protein 3) – наименее изученный белок потивирусов. Установлено, что P3, или частично процессированный белок P3-6K1, может взаимодействовать с P1 и белками CI, NIa и NIb в составе цитоплазматических и ядерных включений. P3 необходим для репликации вируса и играет важную роль в проявлении симптомов, однако его точная роль в вирусной инфекции остается неясной. Обращает на себя внимание высокая вариабельность P3 у



разных потивирусов и его консервативность среди изолятов одного вида, что может означать важную роль РЗ в определении круга хозяев.

Белок 6К1 с мол. м. 6 кДа часто функционирует в составе интермедиата РЗ-6К1. Процессинг по сайту разрезания между РЗ и 6К1 происходит не всегда и, по-видимому, не влияет на жизнеспособность вируса и его инфекционность. Однако при внесении в сайт разрезания мутации, препятствующей процессингу, инфекция была бессимптомна. В растениях *N. benthamiana*, зараженных РРV, 6К1 выявлялся в виде белка 6 кДа.

Белок СI (cylindrical inclusions) формирует в цитоплазме зараженных клеток характерные для потивирусов включения в виде «вертушек» (pinwheels). СI играет важную роль в репликации вирусного генома благодаря нуклеозидтрифосфатазной и РНК-хеликазной активностям, а также, во взаимодействии с РЗN-РIPO, в межклеточном транспорте вируса через плазмодесмы. СI склонен к самосборке в результате взаимодействия N-терминальных доменов молекулы, и многие его активности осуществляются в виде олигомеров и мультимеров. СI взаимодействует с белком PSI-K фотосистемы I *N. benthamiana*. Снижение экспрессии PSI-K ведет к усилению накопления РРV, что говорит о возможной роли этого белка в подавлении вирусной инфекции.

Белок 6К2 с мол.м. 6 кДа благодаря наличию центрального гидрофобного домена индуцирует образование везикул из мембран эндоплазматического сети, в которых собирается репликативный комплекс, и направляет их к хлоропластам, где происходит репликация вируса. Кроме того, на модели вируса А картофеля (*Potato virus A*, РVА) показано участие 6К2 в дальнем транспорте вируса и проявлении симптомов инфекции.

Белок NIa (nuclear inclusion protein a) был впервые идентифицирован как компонент кристаллических включений в ядрах зараженных клеток и как протеаза, отвечающая за процессинг центрального и С-концевого участков полипротеина. В процессе инфекции NIa подвергается протеолизу с образованием VPg и протеазы NIaPro.

VPg ковалентно связан фосфодиэфирной связью с 5'-концом геномной РНК через остаток тирозина и экспонирован на одном из концов вириона. Он выполняет функцию кэп-структуры, связывая факторы инициации трансляции и защищая вирусную РНК от деградации экзонуклеазами. Неупорядоченность структуры VPg может способствовать его гибкому взаимодействию с различными клеточными и вирусными факторами, что позволяет этому белку выполнять несколько ключевых функций в процессе инфекции (Jiang & Laliberte, 2011). Связывая фактор инициации трансляции eIF4E, VPg участвует в трансляции геномной РНК вируса. Несовместимость VPg и eIF4E приводит к устойчивости растений данного вида к потивирусной инфекции. Уридилированный VPg служит затравкой для

синтеза дочерних нитей вирусной РНК. VPg участвует в межклеточном и системном транспорте вируса и тем самым также может определять круг растений-хозяев потивирусов.

Еще один белок ядерных включений, NIb (nuclear inclusion protein b), является РНК-зависимой-РНК-полимеразой, отвечающей за репликацию вирусного генома. Каталитический центр фермента образован консервативными мотивами А, В и С. Мотив А (D-x(4,5)-D) и мотив С (GDD) пространственно сближены, а остатки аспарагиновой кислоты этих мотивов связывают  $Mg^{2+}$  и/или  $Mn^{2+}$ . Остаток аспарагина в мотиве В участвует в различении рибонуклеозидтрифосфатов от дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, что обеспечивает синтез РНК, а не ДНК. Другой функцией NIb является уридилирование VPg, который служит затравкой для синтеза дочерних нитей РНК. Взаимодействие репликазы с клеточным поли(А)-связывающим белком PABP (poly-A binding protein) необходимо для узнавания 3'-конца геномной РНК, начала синтеза дочерней нити вирусной РНК и уридилирования VPg. Мутации в N-конце белка, несущем сигнал ядерной локализации, препятствуют репликации вирусного генома (Shen et al., 2020).

Главная функция БО – инкапсидация вирусного генома. Белок состоит из трех структурных элементов: экспонированных на поверхности вирусной частицы N- и С-концевых доменов и внутреннего корового домена, связывающего геномную РНК в зрелых вирионах. В то время как коровый и С-концевой домен относительно консервативны, неупорядоченный N-конец длиной около 100 аминокислотных остатков является самой вариабельной частью молекулы. В нем локализовано большинство вирус- и штаммспецифичных эпитопов (Shukla et al., 1989) и, в частности, универсальный эпитоп  $^{94/96}DRDVDAG^{100/102}$ , который, как считалось, экспрессирован у любого изолята PPV. Вблизи N-конца молекулы (позиции 11-13 или 12-14) БО содержит мотив DAG, т.е. последовательность из остатков аспарагиновой кислоты (D), аланина (A) и глицина (G), обеспечивающую возможность переноса вируса тлями. Мутации в этом мотиве препятствуют векторной передаче вируса (Atreya et al., 1991). Кроме того, БО играет важную роль в межклеточном и дальнем транспорте вируса и содержит детерминанты хозяйской специфичности.

БО PPV может подвергаться посттрансляционным модификациям. Исследование вирусных препаратов из растений *N. clevelandii* с помощью матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетным разделением (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of flight, MALDI-TOF) масс-спектрометрии показало, что некоторые остатки серина и треонина в N-конце БО PPV штамма D гликозилированы N-ацетилглюкозамином (Fernández-Fernández et al., 2002). В дальнейшем было выявлено гликозилирование БО в препаратах вируса из *N. benthamiana* и *Arabidopsis thaliana* (Chen et

al., 2005). В растениях *A. thaliana* БО гликозилируется хозяйской *O*-*N*-ацетилглюкозаминотрансферазой, называемой SECRET AGENT (SEC) (Scott et al., 2006; Kim et al., 2011). При использовании делеционных мутантов вируса, сайт-направленного мутагенеза и масс-спектрометрии БО PPV из этих растений было установлено гликозилирование остатков треонина в позициях 19, 24, 41, 53 и серина в позиции 65 (Perez et al., 2006; Kim et al., 2011; Perez et al., 2013).

Методом Вестерн-блота с антителами к фосфотреонину и фосфосерину установлено, что БО PPV может быть фосфорилирован (Subr et al., 2007). Денситометрия окрашенных зон показала, что БО изолята штамма М фосфорилирован в 2-3 раза сильнее, чем у штамма D (Fernández-Fernández et al., 2002). При масс-спектрокопии изолята штамма D установлено, что *in vivo* в N-конце БО фосфорилированы остатки серина в позициях 25, 81 и 101. Таким образом, гликозилированию и фосфорилированию подвергаются хотя и соседние, но разные аминокислотные остатки. В отличие от гликозилирования, обнаруженного только в N-конце БО, фосфорилирование происходит и в его коровом домене, где фосфорилированы серин в позиции 118 и остатки треонина в позициях 254 и 313.

Оба типа посттрансляционных модификаций обнаружены в БО как в составе вирусной частицы, так и в виде отдельной молекулы. Эти модификации происходят по одним и тем же аминокислотным остаткам как в экспериментальных травянистых хозяевах, так и в природном хозяине - растениях персика, при этом степень гликозилирования БО в растениях персика оказалась вдвое выше, чем в *N. benthamiana*. Установлено, что БО по крайней мере трех штаммов вируса (D, Res и C) может подвергаться гликозилированию и фосфорилированию. Поскольку фосфорилирование коровых треониновых остатков БО ухудшает его связывание с РНК, предполагается, что таким образом могут регулироваться переключение с трансляции вирусной РНК на ее репликацию, а также межклеточный и дальний транспорт PPV. Мутанты PPV, не способные к фосфорилированию N-конца БО, отличаются пониженной инфекционностью как в травянистых растениях, так и в *P. persica* по сравнению с изолятами дикого типа (Hervas et al., 2020).

### **2.1.3. Процесс вирусной инфекции.**

РНК PPV обладает положительной полярностью и после проникновения вируса в клетку способна к немедленной кэп-независимой трансляции. О депротенизации РНК PPV практически ничего не известно, но у других потивирусов она начинается с 5'-конца генома. Трансляция начинается со второго AUG кодона (нт 147 – 149), однако высококонсервативная последовательность из первых 39 нт геномной РНК PPV (включающая первый AUG кодон) абсолютно необходима для продуктивной инфекции (Simon-Vuela et al., 1997). Белок 6K2 встраивается в мембраны эндоплазматической сети и способствует образованию

мембранных везикул, внутри которых РНК защищена от нуклеаз и формируются первичные репликативные комплексы. В большинстве случаев каждая везикула содержит, по-видимому, один вирусный геном. В процессе внутриклеточного транспорта по элементам цитоскелета везикулы достигают хлоропластов и сливаются с их мембраной. Размножение PPV происходит в основном в хлоропластах, что в итоге приводит к их гибели и проявляется в виде хлоротического рисунка на листьях зараженных растений.

В репликации вирусной РНК участвуют многие белки потивирусов. Коровый репликативный комплекс состоит из вирусной РНК, РНК-репликазы (продукт гена N1b), белка CI, расплетающего геномную РНК благодаря хеликазной активности, VPg, связанного с 5'-концом РНК, и белка 6K2, заякоривающего этот комплекс на мембране. Для полноценной репликации вирусной РНК необходимы также P3 и 6K1, хотя их точная роль неизвестна. В качестве затравки для синтеза дочерних нитей РНК используется белок VPg, уридилированный по остаткам тирозина РНК-репликазой. Репликация происходит типичным для пикорна-подобных вирусов образом с образованием репликативной формы, состоящей из геномной и вновь синтезированной антигеномной РНК, которая служит матрицей для синтеза одновременно нескольких дочерних нитей геномной РНК. Вновь синтезированные дочерние молекулы (+) РНК вовлекаются в трансляцию, повторную репликацию и инкапсидацию с образованием нуклеопротеидов и зрелых вирионов.

Часть везикул достигает плазмодесм, через которые вирусная РНК проникает в соседние клетки. В этом процессе принимают участие пять вирусных белков: CI, BO, HCPro, P3N-PIPO и VPg. Роль P3N-PIPO заключается в транспортировке CI к плазмодесмам и его заякоривании на внутренней поверхности плазмодесм посредством взаимодействия P3N-PIPO с клеточным белком PCaP1. В результате способности к самосборке CI уже на ранних стадиях инфекции формирует вблизи плазмодесм конические структуры, через которые дочерние молекулы вирусной РНК проникают в соседние клетки (Wei et al., 2010). Поскольку ряд мутаций в коровом регионе BO препятствует сборке вирусных частиц и межклеточному транспорту вируса, считается, что через плазмодесмы проникают интактные вирионы или вирусные рибонуклеопротеиды. Детали проникновения через плазмодесмы РНК PPV неизвестны, однако для PVA и PVY показано, что с 5'-концом транспортной формы вирусной РНК ассоциированы VPg, HCPro и CI. CI в составе транспортной формы связывается со своим аналогом в составе конических структур, тем самым направляя вирусную РНК в плазмодесмы. По меньшей мере три вирусных белка: P3N-PIPO, HCPro и BO способны увеличивать диаметр плазмодесм.

Дальний, или сосудистый транспорт потивирусов включает последовательное проникновение вируса из мезофилла в клетки обкладки сосудистого пучка, транспорт по

ситовидным элементам флоэмы, выход из флоэмы в клетки мезофилла апикальных листьев и распространение вируса по всему растению с потоком фотоассимилятов. Сосудистый транспорт осуществляется в форме вирионов или рибонуклеопротеидов. Важную роль в этом процессе у PPV играет N-конец БО. Поскольку N-конец БО неупорядочен и отличается высоким уровнем изменчивости как среди потивирусов в целом, так и между штаммами одного вируса (в частности, PPV), его последовательность как таковая, видимо, не играет роли в дальнем транспорте вируса. Напротив, большое значение может иметь заряд N-конца БО и, возможно, степень его гликозилирования и/или фосфорилирования.

Каждый из этапов сосудистого транспорта предполагает взаимодействие вирусспецифических и хозяйских факторов, несовместимость которых может явиться потенциальным барьером для системного распространения вируса и тем самым модулировать круг хозяев вируса (Hirper et al., 2013). Из вирусспецифических факторов для транспорта потивирусов по флоэме необходимы БО, HCPro, VPg и белок 6K2. Факторы растения-хозяина, взаимодействующие с вирусными белками, изучены хуже и почти исключительно у травянистых хозяев. Например, в растениях *Arabidopsis thaliana* обнаружены по меньшей мере 5 доминантных генов семейства *RTM* (*RTM1* – *RTM5*), продукты которых экспрессируются в тканях флоэмы и обеспечивают устойчивость к потивирусам *Tobacco etch virus*, *Lettuce mosaic virus* и PPV на уровне системного транспорта. Предполагается, что эти белки могут секвестрировать вирусные частицы во время их проникновения в ситовидные элементы флоэмы или препятствовать взаимодействию транспортных форм вируса с хозяйскими факторами, необходимыми для продвижения вируса по сосудам. Эффективность локуса *RTM* в растениях рода *Prunus* не изучена, но у абрикоса и персика обнаружен кластер доминантных генов устойчивости к PPV, которые кодируют функционально сходные белки.

## **2.2. Эпидемиология шарки.**

От растения к растению PPV передается при вегетативном размножении зараженных растений, тлями и при механической инокуляции.

### **2.2.1. Распространение PPV при вегетативном размножении.**

Вегетативное размножение зараженного материала - основной способ передачи PPV от растения к растению. Для закладки садов косточковых культур используют привитые или, реже, укорененные саженцы. Черенки, предназначенные для прививки (привои) или укоренения, нарезают с маточных растений определенных сортов, отобранных по совокупности хозяйственных признаков. Аналогичным образом (путем черенкования маточных растений) получают и клоновые подвои. В плодпитомнике с одного маточного

растения получают десятки черенков. Если маточные растения заражены PPV, вегетативное потомство этих растений - привитые или укорененные саженцы - окажется заражено тем же самым изолятом вируса, которым было заражено материнское растение. Из питомников зараженные саженцы попадают в плодоносящие сады, на дачные и приусадебные участки, где они становятся источником дальнейшего распространения вируса тлями. Еще одним практически значимым примером распространения PPV при вегетативном размножении, обычным для дикорастущих косточковых, является образование зараженной корневой поросли от взрослого растения, зараженного PPV.

### **2.2.2. Распространение тлями.**

Обосновавшись в насаждении косточковых в результате интродукции зараженных саженцев, PPV распространяется в нем многими видами тли семейства *Aphididae* (отряд Hemiptera) непersistентным образом, т.е. без циркуляции и размножения вируса в организме переносчика (Cambra & Vidal, 2017). PPV - единственный вирус косточковых, переносимый тлями. Согласно "мостиковой" модели взаимодействия вируса и тли, мотив КИТС белка HSP70 способствует его связыванию с неидентифицированным пока рецептором внутри стилета тли при проникновении последнего в цитоплазму зараженной клетки. Взаимодействуя с мотивом DAG БО, мотив РТК HSP70 обеспечивает фиксацию вирусной частицы на внутренней поверхности стилета. Таким образом, всасывая сок зараженного растения, тля становится вирофорной. При зондировании листьев других растений крылатыми вирофорными особями вирус десорбируется с поверхности стилета и проникает в клетки здорового растения (Ng and Falk, 2006). В экспериментах с сеянцами персика GF305 установлено, что при одном проколе тля впрыскивала в растительную ткань от нескольких сотен до нескольких сотен тысяч вирионов PPV (в среднем около 26 тыс.). В результате примерно у 20% инокулированных растений развивалась системная инфекция (Moreno et al., 2009). Инкубационный период между приобретением вируса тлей и возможностью его инокуляции в другое растение отсутствует. Хотя адсорбированный в стилете вирус сохраняет инфекционность несколько часов, перенос на другое растение обычно происходит за минуты. Тли могут питаться на упавших плодах или плодах, собранных с зараженных деревьев и складированных вблизи плантаций, и, становясь вирофорными, переносить вирус в район транспортировки собранного урожая (Gildow et al., 2004; Labonne & Dallot, 2006).

Самыми эффективными переносчиками PPV считаются зеленая персиковая тля *Myzus persicae*, таволговая (спирейная) тля *Aphis spiraeicola* и сливовая опыленная тля *Hyalopterus pruni* (Garcia et al., 2014). Потенциальными векторами являются также *Aphis gossypii*, *A. fabae*, *A. craccivora*, *A. hederiae*, *Brachycaudus helichrysi*, *B. cardui*, *B. persicae*, *Phorodon humuli* и ряд других видов (Labonne et al., 1995; Isac et al., 1998; Gildow et al., 2004; Kaya et al., 2014;

Cambra & Vidal, 2017). Всего в качестве переносчиков PPV описано 28 видов тли. Следует, однако, отметить, что бóльшая часть результатов по переносу PPV тлями получена в лабораторных условиях с использованием травянистых растений-хозяев.

Различают два основных вида миграции тлей - переносчиков PPV. После зондирования листа на одном дереве тля меняет местоположение в его кроне или перелетает на соседнее дерево. Более распространен другой способ миграции, при котором тля перелетает на деревья, отдаленные от исходного на несколько рядов. В зависимости от вида тли, вида косточковых и особенностей ландшафта это расстояние варьирует от 10-50 до 200 - 600 метров (Labonne & Dallot, 2006). Максимальный лет тлей – переносчиков PPV наблюдается обычно в мае - июне, однако количество вирофорных особей возрастает ближе к осени (Kimura et al., 2016). Эффективность распространения PPV тлей может быть весьма высока. Так, в персиковых, абрикосовых и сливовых садах в Испании вирус из немногих исходно зараженных деревьев в течение 2 - 5 лет распространялся тлей практически по всему саду площадью несколько гектаров (Gottwald et al., 1995).

Перенос вируса тлями – главная причина распространения PPV в определенном насаждении, между соседними насаждениями и на дикорастущую флору с образованием природных очагов инфекции.

PPV, в природных условиях или экспериментально, способен заражать многие, если не все, виды косточковых рода *Prunus* (семейство *Rosaceae*) (García et al., 2014), а также растения из других таксономических групп (van Oosten, 1970; Llacer & Cambra, 2006; James & Thompson, 2006; Polak, 2006; Llacer, 2006). Поэтому дикорастущие косточковые часто становятся резерватом вируса. Нерешенным остается вопрос о роли сорных травянистых растений в формировании природных очагов. PPV может заражать некоторые виды типичных сорняков, произрастающих в насаждениях косточковых (van Oosten, 1970; Llacer, 2006; Schneider et al., 2011). В сливовых и абрикосовых садах Болгарии были выявлены зараженные PPV растения вероники плющелистной, пастушьей сумки, дикого латука, щавеля, воробейника полевого (Milusheva & Rankova, 2002). При исследовании сорных растений в персиковых садах в Словении PPV штамма M был обнаружен на одуванчике, осоте, вьюнке, паслене черном, клематисе, клевере, цикории (Viršček Marn et al., 2004). В лабораторных условиях PPV переносился тлей *M. persicae* с зараженных растений *N. clevelandii*, гороха, а также клевера, маргаритки и ромашки на сеянцы персика (Krczal and Kunze, 1976; Manachini et al., 2007), демонстрируя возможность переноса вируса с травянистых на косточковые культуры в природных условиях. В то же время, масштабное обследование сорняков в персиковых садах в провинции Онтарио, Канада, массово зараженных PPV штамма D, не выявило ни одного случая заражения сорных растений PPV

(Stobbs et al., 2005). Противоречия между результатами канадских и европейских исследователей, возможно, определяются различиями в видовом составе тлей-переносчиков PPV в этих странах. Также нельзя исключить, что изоляты штамма М из Словении имеют более широкий круг хозяев, чем канадские изоляты штамма D. По-видимому, спорадическое заражение однолетних сорных растений не имеет эпидемиологического значения, а роль многолетних сорняков - потенциальных хозяев PPV - нуждается в дальнейшем изучении (James, 2017).

### **2.2.3. Распространение PPV семенами.**

Некоторые потивирусы могут передаваться семенами (Mink, 1993). Возможность передачи PPV через семена ряда косточковых культур была исследована неоднократно с применением различных методов определения вируса в разных тканях семян. Не обнаружено передачи изолятов штаммов D, М и Rec через семена абрикоса, персика, сливы и алычи (Glasa et al., 1999; Pasquini et al., 2000; Pasquini and Barba, 2006; Milusheva et al., 2008; Kamenova, 2016). Таким образом, в настоящее время считается, что вертикальная передача PPV от инфицированных материнских растений их потомству не происходит. Причины этого не вполне понятны. Установлено, что в семенах, собранных с зараженных растений, вирус может находиться в семенной кожуре и, в значительно меньшем количестве, в семядолях, однако ни разу не был обнаружен в тканях зародыша. Сеянцы, выращенные из таких семян, никогда не показывали типичных симптомов шарки и вирус не определялся в них с помощью ИФА и ОТ-ПЦР. Одной из причин отсутствия проникновения вируса в зародыш считается его элиминация в процессе стратификации и созревания семян. Было показано, что содержание PPV в семядолях нескольких сортов абрикоса и персика существенно снижается после хранения семян при 4°C по сравнению с содержанием вируса непосредственно после сбора семян. Однако, в целом, возможность проникновения в зародыш определяется взаимодействием факторов растения-хозяина и вируса. Штаммы вируса и даже изоляты одного штамма, также как и виды косточковых культур, могут различаться по биологическим свойствам, поэтому вопрос о возможности передачи PPV через семена нельзя считать окончательно решенным (James, 2017).

### **2.2.4. Распространение при механической инокуляции.**

PPV является сокопереносимым вирусом и обычно легко передается посредством механической инокуляции с одного травянистого растения на другое того же или близкородственного вида. Эту возможность используют для накопления вируса с целью его препаративного выделения и для диагностики вируса с помощью биотеста на растениях-индикаторах. Однако механическая передача вируса между плодовыми деревьями в природе



(например, при контакте листьев) считается маловероятной. Также до сих пор не было зафиксировано ни одного случая переноса вируса от растения к растению при обрезке плодовых деревьев секатором. По-видимому, механическая передача, если и случается, не имеет эпидемиологического значения для распространения шарки (Rimbaud et al., 2015a; Gottwald et al., 1995; Dallot et al., 2003).

### **2.3. Генетическое разнообразие PPV.**

На сегодняшний день в GenBank депонировано 4423 частичных и полных нуклеотидных последовательностей изолятов PPV, обнаруженных на различных видах косточковых во многих регионах мира. Такой массив данных позволяет оценить генетическое разнообразие вируса и осуществлять сравнительный анализ новых изолятов.

PPV отличается высоким генетическим разнообразием. При исследовании нескольких европейских изолятов PPV методом иммунодиффузии в агаровом геле с поликлональными антителами к вирусу было установлено наличие двух серологических групп: PPV-D и PPV-M (Kerlan and Dunez, 1979). Иммунохимические различия, как выяснилось впоследствии, соответствовали различиям в геномах этих изолятов и послужили основой для идентификации двух первых штаммов вируса: D (Dideron) и M (Marcus). Современная классификация изолятов PPV основана на анализе их полногеномных последовательностей.

На основании различий в полногеномных последовательностях и филогенетического анализа в настоящее время различают 10 штаммов вируса, которые представляют собой монофилетические группы близкородственных изолятов. Для PPV характерна низкая внутриштаммовая генетическая изменчивость (обычно 1 – 2%) и высокий уровень междуштаммовых различий, которые могут достигать 20 - 25% (García et al., 2014). Штаммы различаются по антигенным и эпидемиологическим свойствам, кругу хозяев, географическому распространению и патогенности для различных видов и сортов косточковых культур (James et al., 2013; Subr & Glasa, 2013; García et al., 2014).

К началу нашей работы (в 2009 году) было известно семь штаммов (в порядке их открытия): D (Dideron), M (Marcus), EA (El Amar), C (Cherry), Rec (Recombinant), W (Winona), T (Turkish) (James et al., 2013; García et al., 2014). В 2012 году был обнаружен штамм An (Ancestor, или Marcus Ancestor) (Palmisano et al., 2012). Еще 2 штамма: CR (Cherry Russian) и CV (Cherry Volga) были открыты в результате наших исследований.

#### **2.3.1. Штамм D.**

Штамм D – самый распространенный в мире. В каждой стране, где обнаружен PPV и проводилось типирование штаммов, изоляты штамма D составляют заметную или большую часть популяции этого вируса (García et al., 2014; Rimbaud et al., 2015a).

Возможно, причиной широкого распространения PPV-D является сравнительная "мягкость" вызываемых им симптомов, которые не всегда легко обнаружить, а тестирование возможной инфекции лабораторными методами анализа долгое время не проводили как ввиду отсутствия доступных экспресс-методов диагностики, так и понимания необходимости такого тестирования (Schneider et al., 2011). Важно отметить, что аттенуация симптомов шарки обусловлена пониженным уровнем накопления PPV в зараженном растении и, таким образом, в отсутствие лабораторного тестирования инфекции, способствует интродукции менее агрессивных изолятов. Одна из возможных мутаций, ослабляющих симптомы вирусной инфекции (C2635R), выявлена в белке N1b у японских изолятов штамма D. Поскольку эта мутация локализована вблизи мотива GDD, абсолютно необходимого для функционирования вирусной репликазы, она может угнетать репликацию вируса, снижать его накопление в *P. tute* и *N. benthamiana* и тем самым ослаблять симптомы инфекции в обоих видах растений (Maejima et al., 2020).

Еще одна причина повсеместного распространения штамма D может состоять в том, что, поскольку из всех известных штаммов PPV-D расположен ближе всего к предполагаемому предку PPV, он, возможно, является самым древним штаммом вируса. В этом случае PPV-D мог иметь больше времени для своего распространения, чем другие штаммы (Sanderson et al., 2017).

Ввиду того, что штамм D является самым распространенным, в GenBank депонировано больше всего последовательностей изолятов именно этого штамма. При их анализе было установлено, что геном изолятов PPV-D состоит из 9786 нт, ген БО кодирует белок из 330 аминокислотных остатков. Идентичность БО составляет 98 - 99% для нуклеотидных и 96 - 99% для аминокислотных последовательностей, соответственно (Matic et al., 2011). Близкие значения идентичности получены и для полных геномов (98,1 - 99,4% на нуклеотидном и 98,2 - 99,6% на аминокислотном уровнях). Таким образом, генетически PPV-D – один из самых консервативных штаммов.

Высокая консервативность геномов PPV-D не является препятствием для его распространения в самых разных агроклиматических условиях и не ограничивает круг косточковых, которые он способен заражать: PPV-D находили на всех основных косточковых культурах, за исключением вишни (*P. cerasus*) и черешни (*P. avium*).

Филогенетический анализ всех известных полногеномных последовательностей выявил две обособленных монофилетических группы изолятов этого штамма. Первая группа представлена изолятами из Западной Европы, США, Канады и Японии, а вторая включает основную массу турецких изолятов. Изоляты из других стран Европы и Азии рассеяны по другим многочисленным кладам (Maejima et al., 2020; Gurcan et al., 2020).

Наиболее полно изучены популяции PPV-D в США (Schneider et al., 2011), Японии (Maejima et al., 2011; Maejima et al., 2020) и Турции (Gurcan et al., 2020). Американские изоляты были выявлены главным образом на персике и сливе в ряде соседних округов штата Пенсильвания. Они отличались низким уровнем генетической изменчивости (полные геномы идентичны на 98,5 – 99,8%), но при филогенетическом анализе четко делились на два кластера, что, как полагают, свидетельствует об интродукции двух изолятов-основателей. По всей вероятности, предковые изоляты были завезены на персике, потому что симптомы шарки на этой культуре были довольно слабые. Однако на сливе те же изоляты индуцировали отчетливые симптомы. Аналогичное объяснение предложено для сосуществования двух популяций PPV-D в Японии на японском абрикосе *P. mume*. Использование метода молекулярных часов показало, что интродукция PPV из Западной Европы в Канаду, Японию и США произошла, соответственно, 41,7, 26,4 и 38,6 лет назад (Hajizadeh et al., 2019). Низкий уровень генетической изменчивости американских, канадских и японских изолятов связывают именно с их недавней интродукцией в эти страны. Напротив, полногеномные последовательности турецких PPV-D, обнаруженных на сливе и абрикосе, отличаются высоким уровнем изменчивости. При филогенетическом анализе большая часть изолятов группировалась в отдельный кластер, обособленный от всех остальных групп изолятов штамма D. Высокая изменчивость и четкая географическая кластеризация по различным регионам страны указывают на длительную эволюцию PPV-D в Турции, что может быть обусловлено близостью к предполагаемому центру происхождения PPV (Gurcan et al., 2020).

Несмотря на высокое сходство геномов, изоляты PPV-D могут существенно отличаться по биологическим свойствам. Так, американские близкородственные изоляты Penn4 и Penn7 с разной эффективностью переносились тлями *M. persicae* и *A. spiraecola*, накапливались в тест-растениях в разных количествах и индуцировали Penn4 - отчетливые, а Penn7 - очень слабые симптомы. Изоляты этого штамма находят преимущественно на сливе и абрикосе и реже на персике. Однако во Франции была обнаружена группа изолятов PPV-D, способных вызывать эпидемию именно на персике (Dallot et al., 1998). Особенностью изолятов из этой субпопуляции были несколько уникальных аминокислотных замен в N-конце БО. Во многом благодаря работам с изолятами штамма D сформировалось понимание того, что те или иные биологические свойства PPV могут являться атрибутом отдельных изолятов, а не штамма в целом.

В Европейской России, по данным ВНИИКР, к штамму D относится около 40% всех выявленных изолятов. В основном они обнаружены на сливе, хотя единичные изоляты были найдены на абрикосе, алыче и войлочной вишне (Приходько и соавт., 2019).

### 2.3.2. Штамм М.

Штамм М считается экономически наиболее значимым в силу его высокой патогенности и способности быстро распространяться тлями в насаждениях персика, сливы и абрикоса (Candresse & Cambra, 2006). Геномная РНК состоит из 9786 нт, ген БО кодирует белок из 330 аминокислотных остатков. Генетическая изменчивость PPV-М оказалась низкой: идентичность последовательностей БО европейских изолятов составила 98-99% на нуклеотидном и 99-100% на аминокислотном уровнях (Matic et al., 2011). Тем не менее, сравнение гена БО и участка генома (Cter)P3-6K1-(Nter)CI европейских изолятов PPV-М показало существование двух четко различающихся популяций. Группа Ма состоит в основном из западноевропейских изолятов, выявленных во Франции, Италии, Греции и на Кипре. Группу Mb представляют центрально- и восточноевропейские изоляты из Болгарии, бывшей Югославии, Чехии и Словакии. В изученных участках генома идентифицированы нуклеотидные позиции, характерные для каждой из этих групп. Две группы PPV-М могли сформироваться из-за географической изоляции в силу долгого отсутствия обмена материалом косточковых культур между странами, расположенными по обе стороны бывшего «железного занавеса» (Dallot et al., 2011).

До последнего времени PPV-М находили только в Европе. Однако недавно многочисленные изоляты этого штамма были обнаружены в Японии (Oishi et al., 2018) и Турции (Gurcan & Ceylan, 2016; Teber & Gurcan, 2017; Gurcan et al., 2019). В Японии PPV-М выявлен на японском абрикосе (*P. mume*), а также на деревьях персика и абрикоса, растущих в частных садах, парках и по обочинам дорог; один изолят найден на войлочной вишне. При филогенетическом анализе полный геном изолята из *P. mume* (LC228949) кластеризовался с изолятами из группы Ма. Часть турецких PPV-М выявлена в молодых садах персика и абрикоса на средиземноморском побережье и в западной части страны. При филогенетическом анализе (Cter)P3-6K1-(Nter)CI участка генома они кластеризовались с европейскими изолятами из группы Ма. Возможно, эти изоляты были интродуцированы с посадочным материалом скороплодных сортов персика и абрикоса, завезенным из Европы (Gurcan & Ceylan, 2016). В то же время, в старых частных садах в окрестностях Стамбула обнаружена дивергентная группа изолятов PPV-М. При филогенетическом анализе гена БО, участка (Cter)P3-6K1-(Nter)CI и полногеномных последовательностей эти изоляты образовывали еще одну, третью обособленную кладу (M-Istanbul, Mis) внутри кластера изолятов штамма М (Gurcan et al., 2019).

В России PPV-М выявлен на сливе в Ставропольском крае и на персике в Краснодарском крае. Филогенетический анализ ампликона размером 243 пн, полученного с праймерами P1/P2 (универсальными праймерами, выявляющими все известные изоляты PPV

(Wetzel et al., 1991b)) показал, что российские PPV-M кластеризуются с центрально- и восточноевропейскими изолятами (PPV-Mb). Во всех случаях зараженные растения происходили из бывшей Югославии и, очевидно, завезены с посадочным материалом косточковых культур при закладке новых садов на Северном Кавказе (Приходько и соавт., 2011).

### **2.3.3. Штамм EA.**

Изоляты штамма EA были впервые обнаружены на местных сортах абрикоса в местечке Эль-Амар в дельте Нила в Египте. Другие изоляты этого штамма найдены в географически отдаленном регионе Эль-Файюм юго-западнее Каира. В некоторых насаждениях частота инфекции достигала 85%. Анализ 3'-концевой части генома этих изолятов показал, что она только на 81% идентична последовательностям изолятов штаммов D и M, указывая на то, что египетские изоляты относятся к новому штамму вируса, который получил название Эль Амар (El Amar, EA) (Wetzel et al., 1991a). Это предположение подтвердилось при анализе полногеномных последовательностей, которые оказались идентичны геномам изолятов штаммов D, M, Rec, C и W на 77 - 80% (Myrta et al., 2006a; Glasa et al., 2006). Большинство изолятов были найдены на абрикосе. Несколько изолятов обнаружено на персике (Youssef & Shalaby, 2006). Изолят PL18 (FN424167) выявлен на сливе японской (*P. salicina*) (Matic et al., 2011). Следует отметить, что PPV-EA находили только в старых насаждениях косточковых культур. В молодых садах вирус не обнаружен (El Maghraby et al., 2007). Анализ БО всех известных на сегодняшний день изолятов PPV-EA показал, что он характеризуется достаточно высоким уровнем изменчивости (1-5%) на нуклеотидном и аминокислотном уровнях.

Штамм EA обнаружен только в Египте, что поднимает проблему его происхождения. То обстоятельство, что изоляты этого штамма демонстрируют высокое генетическое разнообразие и обнаружены только в старых садах, может свидетельствовать о давней интродукции изолятов этого штамма в Египет из другого региона (возможно, Греции или Армении) и их последующей дивергенции при адаптации к новым условиям (James et al., 2013; Najizadeh et al., 2019).

### **2.3.4. Штамм C.**

Вишня и черешня являются экономически значимыми культурами во многих регионах мира и особенно популярны в Европе, на Среднем Востоке, в странах Средиземноморья и Северной Америке (Vujdoso and Hrotko, 2017). Долгое время они считались устойчивыми к PPV. Это мнение было основано на безуспешных попытках заражения черешни и вишни-анטיפки (*P. mahaleb*) изолятами вируса из сливы, персика и абрикоса путем прививки или с

помощью тли *M. persicae*, являющейся одним из самых эффективных векторов PPV (Dosba et al., 1987). Кроме того, не обнаружено ни одного случая заражения деревьев вишни вблизи садов персика и абрикоса, инфицированных PPV-D или PPV-M (Boeglin et al., 2004). Однако в 1989 году появилось первое сообщение об открытии PPV на вишне в Молдове (Kalashyan and Bilkey, 1989). Деревья местных сортов с характерными симптомами шарки на листьях были обнаружены в сортовой коллекции вишни Молдавского НИИ плодоводства, г. Кишинев. Наличие PPV было подтверждено с помощью DAS-ELISA и иммуноэлектронной микроскопии. Дальнейшие исследования одного из этих изолятов, названного SoC, показали, что (i) SoC распознается в ОТ-ПЦР с праймерами P1/P2, что подтверждало его принадлежность к PPV; (ii) вирус выявлялся в листьях, коре, корнях, цветках, плодах и семенах, что указывало на системную инфекцию PPV в вишне. Был секвенирован (Cter)N1b-CP-3'-NCR участок генома этого изолята. Его выравнивание с соответствующими последовательностями других изолятов вируса, доступными в GenBank, показало высокую степень дивергенции SoC от штаммов D, M и EA. Был сделан вывод, что SoC является представителем нового штамма вируса и предложено название PPV-C (Cherry) (Nemchinov & Hadidi, 1996; Nemchinov et al., 1996). Вскоре родственный изолят PPV, названный SwC, был обнаружен на черешне в Италии (Crescenzi et al., 1997). Секвенирование полных геномов SoC и SwC показало их высокое сходство на нуклеотидном (98,9%) и аминокислотном (98,3%) уровнях. Идентичность с полными геномами изолятов штаммов D и M составила 77 - 78%. Геномы SoC и SwC имели типичную для PPV структуру, но состояли из 9795 нт (Fanigliulo et al., 2003), что обусловлено наличием 3 дополнительных, по сравнению с геномами штаммов D и M, триплетов в гене N1a (позиции 6864 - 6866) и гене БО (позиции 8608 - 8610, 8614 - 8616). Следует отметить, что перед секвенированием оба изолята долгое время поддерживались на *N. benthamiana* и могли содержать мутации, обусловленные адаптацией вируса к травянистому хозяину (Wallis et al., 2007; Vozarova et al., 2013). Помимо SoC и SwC из Молдовы и Италии, PPV-C был обнаружен в Венгрии (Nemchinov et al., 2008), Беларуси (Malinowski et al., 2012), Хорватии (Kajic et al., 2012) и Германии (Jelkmann et al., 2018). Определены полные геномы двух белорусских изолятов BY101 (HQ840517), BY181 (HQ840518) (Malinowski et al., 2012) и изолята GC27 из Германии (KY221840) (Jelkmann et al., 2018), выделенных непосредственно из вишни. В зарубежной Европе PPV-C встречается очень редко, только на вишне или черешне и исключительно на отдельных деревьях, поэтому эпидемиологическая значимость этих находок остается неизвестной.

Напротив, в России PPV-C распространен достаточно широко. Изоляты этого штамма были обнаружены на вишне в Московской, Белгородской, Самарской областях и Волгограде в сортовых коллекциях и частных садах, в сортовой коллекции черешни в Московской

сельскохозяйственной академии имени К.А. Тимирязева в Москве (Приходько и соавт., 2011; Glasa et al., 2014). Секвенирован полный геном волгоградского изолята Volk143 (KJ787006). Сравнение полногеномных последовательностей PPV-C, включая изоляты SoC и SwC, показало их высокий консерватизм: уровень дивергенции составил 1,3% (Glasa et al., 2014).

При экспериментальном заражении SoC переносился прививкой или механически на растения черешни, сливы, войлочной вишни, персика и антипки (*P. mahaleb*), а SwC, кроме того, на вишню, абрикос и алычу, вызывая системную инфекцию с типичными симптомами шарки (Kalashyan et al., 1994; Crescenzi et al., 1997; Damsteegt et al., 1997; Nemchinov et al., 1998; Boeglin et al., 2004). SoC заражал также некоторые виды и гибриды косточковых, используемые в качестве подвоев: *P. marianna*, *P. salicina* x *P. cerasifera* x *P. spinosa*, *P. pseudocerasus* x *P. avium* (Bodin et al., 2003). Таким образом, изоляты PPV-C отличаются более широким кругом хозяев, чем другие штаммы вируса, которые не заражают вишню и черешню. В лабораторных условиях SoC переносился от растения к растению тлей *M. persicae*, а SwC еще и свекловичной (бобовой) тлей *A. fabae* (Crescenzi et al., 1997; Nemchinov et al., 1998; Boeglin et al., 2004).

Таким образом, было установлено, что вишня и черешня заражаются изолятами PPV, принадлежащими к штамму C. С тех пор PPV-C считали единственным штаммом вируса, который может системно заражать вишню. Другие штаммы на вишне и черешне до недавнего времени обнаружены не были.

### 2.3.5. Штамм Rec.

Первый изолят штамма Rec был открыт при выравнивании 3'-терминальной последовательности (Cter)NIb-CP-3'-NCR геномов изолята ѓб, обнаруженного в 1990 году на персике в Сербии, и нескольких изолятов штаммов D и M. Оказалось, что C-концевая часть гена NIb изолята ѓб обладает выраженным сходством с изолятами штамма D, а остальная часть 3'-концевой последовательности родственна штамму M. Был сделан вывод о том, что ѓб представляет собой рекомбинант между штаммами D и M. Это было первое обнаружение рекомбинации среди природных изолятов PPV (Cervera et al., 1993). В 1996 году на абрикосе в Словакии был обнаружен изолят BOR-3, 3'-терминальная последовательность которого оказалась более чем на 98% идентична соответствующей последовательности ѓб и, подобно ѓб, содержала брейкпойнт между D- и M-подобными последовательностями в C-концевой части гена NIb в районе нт 8450 (Glasa et al., 2001).

Геном BOR-3 был полностью секвенирован (AY028309) (Glasa et al., 2004). Его длина составляет 9786 нт, ген БО кодирует белок размером 330 аминокислотных остатков. С помощью программы RHYLPRO было предсказано два рекомбинантных события (PC) в геноме BOR-3. Первое из них состояло в рекомбинации между изолятами штаммов D и M с

брейкпойнтом вблизи нт 8450. Таким образом, последовательность (Cter)NIb-CP-3'-NCR) от брейкпойнта до 3'-конца генома происходит от штамма М, а остальная часть генома - от штамма D. Второй слабо выраженный брейкпойнт вблизи нт 2813 ограничивает 5'-концевую последовательность 5'-NCR-P1-NCPro-(Nter)P3. Эти участки генома у изолятов штаммов D, М и BOR-3 различаются, в среднем, на 3,7%, в то время как последовательности за брейкпойнтом - примерно на 13%. Видимо, 5'-концевая последовательность (нт 1 - 2013) унаследована изолятами штаммов D и М от их общего предка. Она присутствует в BOR-3 потому, что 5'-концевая часть его генома происходит от штамма D.

BOR-3 обнаружен на 5-летнем сеянце абрикоса. По всей вероятности, он был занесен на зараженное дерево тлями. Такая возможность была продемонстрирована в лабораторных условиях: BOR-3 переносился тлей *M. persicae* на растения гибрида *P. insititia* x *P. domestica* сорта St. Julien и *N. benthamiana*, а также, но менее эффективно, на сеянцы персика и растения гороха. Кроме того, BOR-3 переносился прививкой на сеянцы персика сорта GF305, но инфекция сопровождалась появлением едва заметных симптомов. При механическом заражении сорта St. Julien развивались типичные симптомы шарки.

Расстояние между местами находок об и BOR-3 составляет несколько сотен километров, что позволило высказать предположение о широком распространении подобных изолятов в Восточной Европе (Glasa et al., 2001). Это предположение подтвердилось при обследовании насаждений косточковых культур в Словакии, во время которого на сливе и алыче были обнаружены многочисленные изоляты PPV, содержащие брейкпойнт в позиции 8450 (Glasa et al., 2002a), и в результате находки близкородственного изолята PPV-ВТ-Н на дикорастущем терне (*P. spinosa*) в Венгрии (Salamon & Palkovich, 2002). Таким образом было показано, что изоляты, близкородственные BOR-3, широко распространены в природе и образуют группу, которую выделили в отдельный штамм вируса под названием PPV-Rec (Recombinant). Упомянутые выше особенности генома BOR-3 оказались характерны для полногеномных последовательностей всех других изолятов этого штамма. Внутриштаммовая изменчивость полных геномов PPV-Rec составила 1,5 - 2,4%.

Изоляты PPV-Rec обнаружены в Словакии, Чехии, Германии, Венгрии, Болгарии, Албании, бывшей Югославии, Италии и Франции (Glasa et al., 2004; Glasa et al., 2005a; Myrta et al., 2006b; Matic et al., 2006; Kajic et al., 2008; Gadiou et al., 2008; Svanella-Dumas et al., 2015; Kamenova & Borisova, 2019; Dallot et al., 2020). Штамм Rec оказался, наряду с PPV-D и PPV-M, самым распространенным в зарубежной Европе, составляя примерно треть европейских изолятов. Возможно, бывшая Югославия является центром происхождения этого штамма, откуда PPV-Rec распространился по Европе с толерантными сортами сливы (Glasa et al., 2005). Интересно отметить, что именно изоляты штамма Rec были обнаружены в каждом из



восемью старыми (свыше 70 лет) деревьями сливы в том районе Болгарии, где впервые была обнаружена шарка (Kamenova & Borisova, 2019).

Помимо Европы, PPV-Rec находили в Турции (Candresse et al., 2007; Gurcan & Ceylan, 2016), Канаде (Thompson et al., 2009) и Пакистане (Kollerova et al., 2006). Тем не менее, за пределами Центральной и Восточной Европы PPV-Rec встречается очень редко, что, по-видимому, является еще одним свидетельством его возможного происхождения на Балканах (Glasa et al., 2005). В России и на постсоветском пространстве вообще изоляты PPV-Rec вплоть до наших исследований обнаружены не были.

Хотя PPV-Rec находили на персике, алыче и абрикосе, большая часть изолятов (88%) была выявлена на сливе (*P. domestica*). Таким образом, PPV-Rec явился еще одним (наряду с PPV-C) штаммом вируса с четко выраженной, хотя и не абсолютной, хозяйской специфичностью (Sihelska et al., 2017).

### **2.3.6. Штамм W.**

Первый изолят штамма W (W3174) был найден на сливе в частном саду в провинции Онтарио, Канада (James et al., 2003). Он определялся в TAS-ELISA и иммуноблоте с антителами 5В и в ОТ-ПЦР с праймерами P1/P2 и, таким образом, несомненно представлял собой PPV. Вместе с тем, W3174 не распознавался антителами к штаммам D, M, C и EA и в ОТ-ПЦР с праймерами к этим штаммам. При филогенетическом анализе гена N1b последовательность W3174 располагалась отдельно от кластеров, образуемых изолятами штаммов D, M, C и EA (James and Varga, 2004). Этот результат подтвердился при анализе полногеномной последовательности (AY912055) (James and Varga, 2005). Сходство полного генома W3174 с другими штаммами составило 79-80%, полипротеин оказался идентичен на 89-90%. На этом основании было предложено считать W3174 представителем нового штамма Winona (зараженное дерево сливы было обнаружено по дороге, именуемой "Winona road"). По словам владельца сада, дерево было украинского происхождения. В 2006 году карантинной службой США в пробирочных растениях косточковых культур, ввезенных из Украины, были выявлены два других изолята PPV-W UKR44189 (JN596110) и UKR44191 (Mavrodieva et al., 2013). Еще 4 изолята PPV-W ((LV-140pl (HQ670745), LV-141pl (HQ670746), LV-143pl (HQ670747), LV-145bt (HQ670748)) обнаружены в Латвии на сливе и терне (Glasa et al., 2011). Кроме того, изолят KZ12 (MH836582, MK450442), был недавно найден на сливе с четкими симптомами шарки в Казахстане. Последовательности (Ster)N1b-(Nter)CP и гена CI этого изолята оказались на 99% идентичны соответствующим участкам генома российских изолятов (раздел 3.2.4) из Московской (STNB1, STNB2, RD4) и Тверской (Pk) областей (Dallot et al., 2019).

Геномы изолятов LV-145bt, UKR44189 и W3174 состоят из 9786 нт, а геном LV-141pl – из 9789 нт. Эти различия обусловлены разной длиной гена БО, который состоит либо из 990 нт и кодирует белок из 330 аминокислотных остатков, либо (LV-141pl) из 993 нт и кодирует белок из 331 аминокислотного остатка. Обнаружены два РС в изоляте W3174. Одно из них локализовано в генах P1 и NSPro (нт 692-1424) и представлено последовательностью, родственной PPV-M, а другое - последовательностью, родственной PPV-D (ген VPg, нт 5672-5789) (Myrta et al., 2006b; Glasa et al., 2011). Геномы LV-141pl и LV-145bt не содержат признаков рекомбинации и, возможно, представляют собой "предковые" формы PPV-W.

Сходство полных геномов UKR44189 из Украины и LV-145bt из Латвии превышало 99%, а ген БО идентичен на 99,8%. Практически полная идентичность этих изолятов, а также отсутствие других PPV-W за пределами бывшего СССР привело к предположению о восточно-европейском (Croft *et al.*, 2008) или украинском/российском (Glasa et al., 2011) происхождении штамма W. Таким образом, хотя PPV-W был впервые обнаружен в Канаде, весьма вероятно, что он завезен туда из бывшего СССР.

### **2.3.7. Штамм Т.**

В 1998 году в Турции в окрестностях Анкары на абрикосе был обнаружен изолят Ab-Tk (Abricotier Turquie), который в ОТ-ПЦР распознавался только праймерами к штамму М, но в TAS-ELISA реагировал с моноклональными антителами 4DG5 к штамму D и не распознавался моноклональными антителами AL к штамму М (Candresse et al., 1998). Для определения штаммовой принадлежности Ab-Tk были секвенированы два протяженных участка его генома: 3'-концевой участок (Ster)NIb-CP-3'-NCR и 5'-концевой участок, включающий часть 5'-NCR, гены P1, NSPro, P3, 6K1 и N-терминальный сегмент гена CI (Glasa & Candresse, 2005). 3'-конец генома Ab-Tk оказался на 96% идентичен таковому изолятов штаммов М и Res и менее чем на 88% изолятов всех остальных штаммов, включая D. Анализ последовательности N-конца БО Ab-Tk выявил девять замен в предполагаемом PPV-M-специфичном эпитопе, а также присутствие PPV-D-специфичного эпитопа PATKP (вместо типичной для PPV-M последовательности PAVRP). Таким образом, 3'-конец Ab-Tk несомненно принадлежит к группе PPV-M-подобных изолятов, а его аномальное поведение в TAS-ELISA обусловлено точечными мутациями в соответствующих эпитопах.

При анализе полногеномной последовательности Ab-Tk (Serce et al., 2009) было выявлено РС между нт 1567 и 2813, охватывающее примерно 2/3 гена NSPro и N-терминальный участок гена P3. Происхождение рекомбинантной последовательности выяснить не удалось, поскольку она показывала высокий уровень дивергенции от всех известных на тот момент штаммов вируса (D, M, Res, EA, W и C). Было установлено, что изоляты, родственные Ab-Tk, широко распространены на абрикосе в провинции Анкара.

Сообразно с особенностями генома изолятов этой группы и их распространенностью в полевых условиях, было предложено выделить эту группу в отдельный штамм и назвать его PPV-T (Turkish) (Serce et al., 2009). Анализ родственных изолятов показал также, что мутация в мотиве DAG, ответственного за перенос вируса тлями (GAG вместо DAG) и аномальное поведение при штаммотипировании в TAS-ELISA являются характерной чертой изолята Ab-Tk, а не штамма PPV-T в целом.

Молекулярные свойства изолятов штамма Т были подробно изучены в масштабном исследовании Teber et al. (2019). На абрикосе и сливе в западной части Турции был собран и проанализирован 421 изолят PPV-T. Поскольку ни иммунохимические, ни молекулярные методы выявления изолятов этого штамма не разработаны, их идентификация была основана на секвенировании 3'-концевого и центрального (P3-6K1) участков генома с последующим филогенетическим анализом. Секвенированы 57 полногеномных последовательностей. Установлено, что PPV-T распространен по всей западной Турции, включая черноморское и средиземноморское побережья, окрестности Стамбула и Европейскую часть страны. Полные геномы имеют длину 9786 нт. Ген БО длиной 990 нт кодирует белок размером 330 аминокислотных остатков. Филогенетический анализ выявил несколько монофилетических групп изолятов PPV-T и их географическую кластеризацию, указывающую на автохтонность и длительную эволюционную историю этого штамма на территории Турции. Анализ полногеномных последовательностей с высокой вероятностью ( $P$ -values  $\sim 10^{-30}$ ) подтвердил наличие единственного РС в 5'-регионе генома. Брейкпойнты, в зависимости от изолята, картированы в районе нт 1557 – 1591 и 2679 – 2749. Таким образом, это РС является характерной особенностью изолятов штамма Т. Основным родителем является, по-видимому, изолят штамма An (см. ниже), а минорным родителем – изолят штамма D.

Помимо Турции, PPV-T был однажды обнаружен на сливе в Албании (Palmisano et al., 2015). Ген его БО оказался на 99% идентичен изоляту Ab-Tk.

### **2.3.8. Штамм An.**

Единственный изолят этого штамма AL11pl был найден на сливе в Албании (Palmisano et al., 2012). Последовательность полного генома AL11pl (HF674399) состоит из 9786 нт без учета поли-А-последовательности на 3'-конце генома и обладает наибольшим сходством (93,5% идентичности) с изолятом Ab-Tk, принадлежащим к штамму Т. На основании изучения полногеномной последовательности AL11pl был сделан вывод о том, что этот изолят является, по-видимому, представителем нового штамма PPV-An (Ancestor) и эволюционным предшественником штамма М, в связи с чем предложено его другое название – PPV-MA (Marcus Ancestor) (James et al., 2013; García et al., 2014). Открытие этого изолята имело большое значение для понимания эволюционной истории PPV, так как позволило

прояснить возможные эволюционные связи между штаммами М и Т и, в частности, объяснить происхождение штамма Т.

### 2.3.9. Штаммы CR и CV.

Штаммы CR (Cherry Russia) и CV (Cherry Volga) были открыты при выполнении данной работы. Их свойства охарактеризованы в главе «Результаты и Обсуждение».

Возможные эволюционные связи между известными штаммами вируса представлены на рис. 3. Филогенетическое дерево реконструировано на основе всех доступных полногеномных последовательностей изолятов штаммов PPV и включает штаммы CR и CV, открытые в нашей работе. Это дерево показывает, что все известные штаммы распределены между двумя суперкластерами, один из которых состоит из изолятов штаммов EA, D, Rec, An, M и T, а второй – из изолятов штаммов W, CR, C и CV.

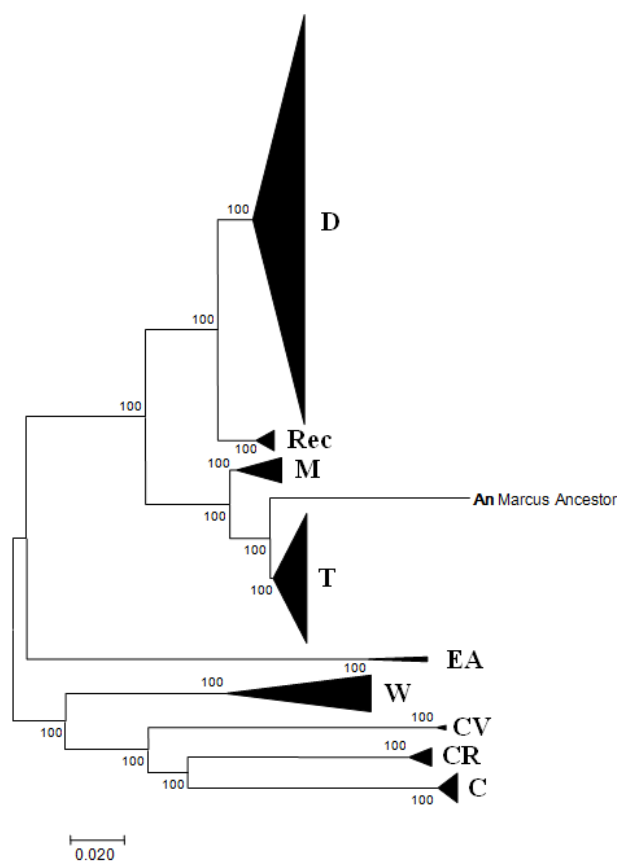


Рис. 3. Филогенетический анализ полногеномных последовательностей изолятов PPV. Дерево реконструировано методом присоединения соседей с помощью программы MEGA7. Значения бутстрэп-анализа (%) указаны рядом с узлами. Черными треугольниками обозначены группы изолятов соответствующего штамма вируса. Масштабная черта показывает число замен на 1 нуклеотид.

## **2.4. Методы диагностики PPV и определения штамма вирусного изолята.**

### **2.4.1. Диагностика вируса.**

Ввиду того, что PPV индуцирует характерные симптомы на листьях и плодах зараженных растений (Рис. 1), визуальное выявление инфекции при обследовании насаждений косточковых культур по сей день остается самым простым и довольно эффективным методом диагностики вируса. Зачастую зараженность шаркой впервые замечают при сборе урожая по симптомам на плодах. Наиболее ярко симптомы заболевания проявляются на полностью распустившихся листьях молодых побегов корневой поросли и годового прироста. Однако диагностика PPV по симптомам возможна только в короткий промежуток времени. Кроме того, проявление симптомов инфекции зависит от многих факторов. Существует латентный период инфекции: от момента заражения вирусом тлями до проявления симптомов может пройти несколько месяцев или лет (Rimbaud et al., 2015b). Некоторые изоляты штамма D вызывают едва заметные симптомы или вовсе их не индуцируют (Schneider et al., 2011). Одной из важнейших особенностей PPV является неравномерное распределение вируса в кроне зараженных растений. На проявление симптомов влияют вид, сорт и возраст растения-хозяина. Толерантные сорта косточковых могут оставаться бессимптомными. Поэтому для надежной диагностики PPV были разработаны биологические, иммунохимические и молекулярные методы лабораторного и внелабораторного анализа. Условия применения некоторых из них сформулированы в протоколах Европейской организации по защите и карантину растений (European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO) (EPPO, 2004; EPPO, 2012).

#### **2.4.1.1. Биотесты на растениях-индикаторах.**

Биологические методы основаны на заражении тестируемым образцом травянистых или древесных растений-индикаторов (Gentit, 2006). Использование различных видов травянистых растений возможно потому, что PPV является типичным сокопереносимым вирусом и заражает широкий круг растений-хозяев (разделы 2.2.2 и 2.2.3). Травянистые индикаторы заражают посредством механической инокуляции. Растения *Chenopodium foetidum* и *Nicandra physalodes* реагируют на заражение образованием местных некрозов; в растениях табака *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. acuminata* и гороха развивается системная инфекция, проявляющаяся в виде мозаики и деформации листьев. Результаты биотестов на травянистых растениях-индикаторах были положены в основу первой классификации штаммов PPV. Сообразно типу реакции *N. clevelandii* на механическое заражение вирусом, вирусные изоляты были разделены на 3 штамма: хлоротический, некротический и хлоротически-некротический (Sutic et al., 1971). Однако этот критерий не охватывал всего

многообразия изолятов PPV и, с развитием молекулярных методов анализа, классификация стала основываться на последовательности их геномов.

В качестве древесных индикаторов используют сеянцы персика сорта GF305, алычи сорта GF31, гибрида *P. persica* x *P. davidiana* сорта Nemaguard, или войлочной вишни. Древесные индикаторы используют в качестве подвоя, прививая на них части побегов тестируемого растения. Несмотря на то, что диагностика с помощью биологических методов занимает от нескольких дней до нескольких лет, а сами методы трудоемки и ресурсоемки, они до сих пор используются в сертификационных схемах, поскольку позволяют выявлять большинство вирусных изолятов, диагностировать комплекс вирусов при смешанных инфекциях и отличаются высокой чувствительностью.

#### **2.4.1.2. Иммунохимические методы.**

Иммунохимические методы основаны на выявлении БО вируса с помощью поликлональных или моноклональных антител (Cambra et al., 2006b). Основным методом является ИФА, сэндвич-вариант которого (double antibody sandwich ELISA, DAS-ELISA) в его планшетном варианте для диагностики вирусов растений, включая PPV, был разработан в 1977 году (Clark & Adams, 1977; Adams, 1978). В DAS-ELISA поликлональные антитела к PPV используют для сорбции на твердой фазе и приготовления конъюгата. В качестве ферментной метки применяют щелочную фосфатазу. Чувствительность DAS-ELISA составляет около 1 нг/мл, что позволяет надежно выявлять вирус в симптоматичных и бессимптомных листьях, в т.ч. в сборных образцах, и кожице плодов косточковых культур в течение всего вегетационного периода. Ряд зарубежных фирм (Agdia, Bioreba, Loewe) производят наборы различной комплектации для определения PPV с помощью DAS-ELISA, использование которых облегчает диагностику вируса и способствует получению воспроизводимых результатов.

Мышинные моноклональные антитела к PPV применяют в непрямом сэндвич-варианте ИФА, называемым double antibody sandwich indirect ELISA (DASI-ELISA) или triple antibody sandwich ELISA (TAS-ELISA). Для диагностики PPV используют антитела 5B, которые распознают т.н. универсальный эпитоп БО PPV, представленный последовательностью  $^{94/96}\text{DRDVDAG}^{100/102}$  на стыке N-конца БО и его корового домена (Cambra et al., 1994; Candresse et al., 2011). До недавнего времени считалось, что эта последовательность присутствует в БО любого изолята PPV. Поэтому TAS-ELISA с использованием антител 5B рассматривали как самый надежный иммунохимический метод диагностики вируса. Антитела 5B поставляются фирмой Agritest S.r.l. (Италия) в составе наборов K-10B.

Еще одним методом является иммунохроматография на тест-полосках (lateral flow device) (Mumford et al., 2001; Бызова и соавт., 2010; Maejima et al., 2014). В тест-полосках

используют поликлональные антитела к PPV, которые иммобилизуют в аналитической зоне пористой мембраны и на частицах коллоидного золота или окрашенного латекса (Mumford et al., 2001). При наличии вируса в экстракте в аналитической зоне тест-полоски формируется окрашенная полоса красного (коллоидное золото) или голубого (латекс) цвета. Время анализа составляет 2 – 5 мин, чувствительность метода достигает нескольких нанограмм вируса в 1 мл экстракта. Метод не требует применения лабораторного оборудования и предназначен для диагностики вируса в полевых условиях, главным образом для подтверждения визуально наблюдаемой инфекции. Тест-полоски для внелабораторной диагностики PPV выпускаются рядом фирм под названием AgriStrip и AgriStrip-magnetic (Bioreba, Швейцария), ImmunoStrip® for Plum pox virus (PPV) (Agdia, США), Plum Pox Virus Immunochromato (Nippon Gene, Япония).

#### **2.4.1.3. Молекулярные методы диагностики.**

Среди молекулярных методов диагностики PPV ведущее место занимает классический вариант ОТ-ПЦР с детекцией образующегося продукта электрофорезом в геле агарозы. Стартовым материалом для обратной транскрипции обычно является тотальная РНК, выделенная из анализируемой ткани растения. В качестве затравки для ОТ используют олиго-dT-праймер длиной 15 – 20 нт, обратный (антисмысловый) вирусспецифический праймер или рассеянную затравку длиной 6 - 10 нт. В ПЦР используют универсальные праймеры P1/P2 (Wetzel et al., 1991b), амплифицирующие С-концевой участок гена БО с образованием продукта 243 пн, или праймеры для амплификации 3'-некодирующего участка генома, генерирующие продукт ПЦР размером 220 пн (Levy & Hadidi, 1994). Обе пары праймеров позволяют выявлять любой вирусный изолят. Нередко используют более чувствительную иммуноспецифическую ОТ-ПЦР с теми же парами праймеров (Wetzel et al., 1992). В этом варианте стартовым материалом для ОТ является геномная РНК из вирусных частиц, полученных с помощью иммуносорбции на поликлональных антителах к PPV.

ОТ-ПЦР в реальном времени для диагностики PPV разработана в двух вариантах. В первом используется неспецифическая система детекции образующейся в ходе реакции двунитевой ДНК с помощью интеркалирующего красителя SYBR Green I (Varga & James, 2005). В специфической системе детекции используются линейные разрушаемые зонды, комплементарные внутреннему участку ожидаемого продукта ПЦР (система TaqMan) (Schneider et al., 2004; Olmos et al., 2005). При отжиге праймеров зонд, меченый флуорофором и гасителем флуоресценции, связывается с ампликоном и разрушается за счет 5'-экзонуклеазной активности *Taq*-полимеразы. Поскольку энергия, испускаемая флуорофором, больше не поглощается удаленным гасителем, уровень флуоресценции прямо зависит от степени разрушения зонда, и, таким образом, интенсивность сигнала возрастает с

каждым циклом ПЦР пропорционально накоплению ампликонов. В то время как классическая ОТ-ПЦР может выявлять РНК в концентрации 100 фг/мл, чувствительность ОТ-ПЦР в реальном времени достигает 2 фг/мл РНК (EPPO, 2012). Такая чувствительность позволяет надежно определять PPV в бессимптомных растениях косточковых культур на самых ранних стадиях инфекции, в зимний период, в различных органах и тканях (например, в коре), в единственной особи вирофорной тли (Olmos et al., 2005), что обеспечивает возможность круглогодичного тестирования PPV.

TAS-ELISA с антителами 5В отличается наибольшей специфичностью и обладает достаточной чувствительностью для надежного выявления PPV в сборных образцах из четырех листьев, собранных в весенний или летний период. ПЦР в реальном времени может быть использована для выявления PPV в сборных образцах до десяти листьев. Комбинация этих методов обеспечивает 100% точность диагностики PPV в косточковых в любое время года (Vidal et al., 2012).

Постоянно создаются новые варианты, позволяющие повысить чувствительность диагностики и/или расширить область применения молекулярных методов анализа. Из таких сравнительно новых разработок следует отметить, прежде всего, изотермическую ПЦР-амплификацию. Вариант loop-mediated isothermal amplification (LAMP) основан на использовании термостабильной *Bst* ДНК-полимеразы *Bacillus subtilis*, которая способна копировать матрицу, вытесняя из дуплекса одну из родительских нитей ДНК, и поэтому не нуждается в термоциклере. Для диагностики PPV этот метод разработан Varga & James (2006a). Еще одним вариантом изотермической амплификации является рекомбиназная полимеразная амплификация (recombinase polymerase amplification, RPA) (Lobato & O'Sullivan, 2018), разработанная для диагностики PPV фирмой Agdia (AmplifyRP<sup>®</sup> test). Анализ выполняется при постоянной температуре 39°C в формате ПЦР в реальном времени или на тест-полосках в специально разработанной камере для детекции ампликонов и занимает 20 мин, включая время для приготовления неосветленных экстрактов. Продемонстрирована возможность выявления 9 известных штаммов PPV (изоляты PPV-CV не тестировали). Чувствительность AmplifyRP<sup>®</sup> позволяет выявлять до 1 фг РНК, что сравнимо с чувствительностью ПЦР в реальном времени. Метод пригоден как для лабораторного, так и для внелабораторного применения (Zhang et al., 2014).

Нередко растение оказывается заражено несколькими вирусами, и их одновременная диагностика позволяет ускорить анализ и снизить его стоимость. С этой целью разработаны мультиплексные варианты молекулярных методов анализа, например, молекулярная гибридизация с применением смеси олигонуклеотидных или поливалентных зондов, чиповая технология. Мультиплексная классическая ПЦР (ОТ-ПЦР) или ПЦР в реальном времени



позволяет одновременно детектировать до десяти разных вирусов одновременно и является до сих пор наиболее распространенным способом мультиплексного анализа. Однако самым высоким мультиплексным потенциалом обладает метагеномный анализ, основанный на высокопроизводительном секвенировании (high-throughput sequencing, HTS) нуклеиновых кислот из зараженного растения (Pallas et al., 2018).

#### **2.4.1.4. Метагеномный анализ.**

Важнейшим событием для развития исследований по диагностике вирусов растений и характеристики их геномов стала пионерская работа Adams et al. (2009), в которой впервые в фитовирусологии был применен метагеномный анализ для диагностики вирусов в растениях томатов и *Gomphrena globosa*. Библиотеки кДНК, полученные на основе тотальной РНК из растений с симптомами предполагаемой вирусной инфекции, секвенировали с помощью пиросеквенирования на геномном секвенаторе GS-FLX. Анализ полученных прочтений позволил диагностировать в томатах известный вирус *Pepino mosaic virus* и собрать на доступной в GenBank референсной последовательности полные геномы новых изолятов этого вируса, а также выявить в гомфрене новый кукумовирус *Gayfeather mild mottle virus*. Одним из важнейших результатов этой работы явился вывод о неоптимальности использования для HTS библиотек кДНК на основе тотальной РНК ввиду превалирования хозяйских последовательностей среди полученных прочтений.

Последующее десятилетие ознаменовалось беспрецедентным развитием этого подхода применительно к диагностике и молекулярной характеристике вирусов растений (Villamor et al., 2019; Perez-Losada et al., 2020).

Поскольку тотальная РНК не является оптимальной матрицей для синтеза библиотек кДНК с целью их последующего секвенирования с помощью HTS, были разработаны методы повышения доли вирусспецифических последовательностей в анализируемом образце. Предварительное удаление рибосомальной РНК или выделение полиаденилированной мРНК явились самыми простыми и весьма эффективными способами обогащения образца целевыми последовательностями, хотя они и не приводили к удалению клеточных мРНК. Поскольку в жизненном цикле большинства РНК-содержащих вирусов присутствует стадия двунитевой РНК, ее использование в качестве матрицы для синтеза библиотек кДНК также способствовало решению проблемы. Важным достижением явилась разработка способа синтеза библиотек кДНК на основе малых РНК, которые накапливаются в зараженной клетке в результате защитной реакции растения на вирусную и виroidную инфекции. Этот способ отличается наибольшей универсальностью, поскольку позволяет детектировать и собирать геномы как РНК-, так и ДНК-содержащих вирусов с различными типами геномов, а также виroidов (Pooggin, 2018; Massart et al., 2019). Использование библиотек кДНК, обогащенных

целевыми последовательностями, позволяет повысить чувствительность и специфичность детекции вирусов с помощью HTS (Pescman et al., 2017).

Из четырех существующих в настоящее время платформ для HTS второго поколения (next generation sequencing, deep sequencing, massive parallel sequencing) – Roche 454, Illumina/Solexa, ABI/Solid и Ion Torrent – в фитовирусологии применяют главным образом первые две. Обе используют в качестве стартового материала копию кДНК с исходной молекулы РНК. Метод, используемый в платформе 454, называется пиросеквенированием, поскольку он основан на регистрации акта присоединения нуклеотида по образуемому пирофосфату с помощью каскада последовательных химических реакций, заканчивающихся высвечиванием кванта света. Метод, используемый в платформе Illumina, основан на регистрации акта присоединения нуклеотида по отщепляемой флуоресцентной метке. Детектируемые цифровой матрицей световые сигналы преобразуются в последовательность нуклеотидов с помощью соответствующего программного обеспечения (Ребриков и соавт., 2014).

Независимо от платформы, результатом HTS является получение большого количества (десятков и сотен миллионов) перекрывающихся прочтений, так что в итоге каждый нуклеотид анализируемой последовательности прочитывается многократно. Чем больше глубина прочтения (depth of coverage), тем достоверней оказывается результат секвенирования, как с точки зрения точности определения последовательности, так и воспроизводимости результатов метагеномного анализа.

Для анализа полученных прочтений и их сборки в протяженные последовательности (контиги) разработано большое количество программ, позволяющих оптимизировать и в известной мере стандартизировать все стадии сборки и биоинформационного анализа последовательностей (Lambert et al., 2018).

В последние годы метагеномное секвенирование стало важным инструментом диагностики вирусов растений и привело к открытию многих новых вирусов плодовых культур (Rubio et al., 2017; Rott et al., 2017; Maliogka et al., 2018; Maree et al., 2018).

Метагеномный анализ потенциально позволяет (i) диагностировать одновременно все вирусы, присутствующие в анализируемом образце, тем самым радикально сокращая время диагностики и затраты на ее осуществление; чувствительность выявления вирусов плодовых культур с помощью HTS оказалась сопоставимой с чувствительностью ПЦР в реальном времени и биотеста на растениях-индикаторах (Rott et al., 2017); (ii) выявлять новые вирусы или новые варианты известных вирусов без предварительных сведений об их геномах и в отсутствие специфических диагностических средств; выявление новых вирусов может способствовать выяснению этиологии заболевания; (iii) собирать из полученных прочтений

геномы как новых, так и известных вирусов. Информация о полученных последовательностях может быть использована, в частности, для изучения структуры вирусной популяции, в т.ч. в отдельном растении (квазивидов), эволюционной истории вирусов, а также разработки специфических молекулярных методов диагностики (Barba et al., 2014; Massart et al., 2014; Roossinck et al., 2015).

#### **2.4.2. Определение штамма вируса.**

Идентификация штамма вирусного изолята имеет большое значение для изучения структуры и динамики вирусной популяции. Она важна и с прогностической точки зрения, поскольку штаммы различаются кругом хозяев, эпидемиологическими характеристиками и патогенностью для различных видов косточковых культур.

Для определения штаммов используют TAS-ELISA со штаммспецифичными моноклональными антителами и ОТ-ПЦР со штаммспецифичными праймерами. Моноклональные антитела к штаммам D (4DG5), M (AL), C (AC) и EA (EA24) поставляются фирмой Agritest S.r.l. (Италия) в составе наборов K-12B, K-11B, K-14B и K-13B, соответственно.

Методы специфической диагностики изолятов штамма D основаны на использовании TAS-ELISA с моноклональными антителами 4DG5 (Cambra et al., 1994) и ОТ-ПЦР. Предполагаемый PPV-D-специфичный эпитоп картирован в N-конце БО внутри последовательности <sup>49</sup>FTPATTTQPA TKPV<sup>62</sup> (Candresse et al., 2011). ПЦР с праймерами P1/PD генерирует продукт размером 198 пн (Olmos et al., 1997). Праймеры mD5/mD3 амплифицируют участок генома (Cter)NIb-(Nter)CP с образованием продукта 664 пн (Subr et al., 2004).

Методы специфической диагностики изолятов штамма M основаны на использовании TAS-ELISA с моноклональными антителами AL (Boscia et al., 1997) и ОТ-ПЦР. Предполагаемый PPV-M-специфичный эпитоп находится в N-конце БО внутри последовательности от 67 до 81 аминокислотного остатка (Candresse et al., 2011). ПЦР с праймерами P1/PM генерирует продукт размером 198 пн (Olmos et al., 1997). Праймеры mM5/mM3 амплифицируют участок генома (Cter)NIb-(Nter)CP с образованием продукта 459 пн (Subr et al., 2004).

Для идентификации изолятов штамма EA были получены моноклональные антитела EA24 (Murta et al., 1998). Локализация эпитопа, распознаваемого антителами EA24, неизвестна. Однако для распознавания PPV-EA в TAS-ELISA критичен остаток гистидина в позиции 65 БО. Изолят APR50, у которого гистидин в этой позиции заменен на аргинин, не распознается антителами EA24. Для определения PPV-EA в ОТ-ПЦР разработаны праймеры M8/M9, амплифицирующие участок гена БО размером 167 пн (Szemes et al., 2001).

Для идентификации PPV-C разработаны методы, основанные на ИФА и ОТ-ПЦР. Получены моноклональные антитела АС, распознающие изоляты PPV-C в TAS-ELISA и в иммуноблоте (Myrta et al., 2000). Для диагностики PPV-C с помощью ПЦР разработаны три пары праймеров, таргетирующих различные 5'-терминальные участки гена БО. Праймеры HSoC-1up/HSoC-1dn генерируют продукт ПЦР размером 259 пн. Праймеры SoC-2/up/SoC-2/dn амплифицируют последовательность длиной 193 пн и, в силу высокой температуры отжига (62°C), обеспечивают высокую специфичность анализа (Nemchinov & Hadidi, 1998; Nemchinov et al., 1998). Еще одна пара праймеров M10-5' и M11-3' генерирует продукт ПЦР размером 224 пн (Szemes et al., 2001).

Для диагностики штамма W на основе последовательности изолята W3174 были разработаны праймеры 3174SP-F3/R1, амплифицирующие участок гена БО размером 327 нт (James & Varga, 2004). При анализе всех доступных последовательностей PPV-W была разработана еще одна пара праймеров W8328F/W8711R для идентификации этого изолятов этого штамма, которые таргетируют (Cter)NIb-(Nter)CP регион генома (Glasa et al., 2011). Также получены несколько моноклональных антител и картированы распознаваемые ими эпитопы в N-конце БО W3174 (Croft et al., 2008). В качестве антигена использовали рекомбинантный пептид, соответствующий N-концу БО единственного известного на тот момент изолята W3174. В частности, антитела 2C3 и 10G7 распознавали эпитоп <sup>2</sup>DEEDD<sup>6</sup>; антитела 10E9 и 5C1 реагировали с последовательностью <sup>58</sup>PSVKP<sup>62</sup>; антитела 4A11, 5B4 и 7B8 распознавали последовательность <sup>46</sup>MFNPV<sup>50</sup>. Последовательность <sup>46</sup>MNFP<sup>49</sup>, помимо PPV-W, встречается в БО штаммов D, M и EA, однако валин (V) или родственный ему изолейцин (I) в позиции 50 уникален для PPV-W. Антитела 4A11 не реагировали со штаммами D, M, C и EA в TAS-ELISA и на иммуноблоте.

Следует отметить, что, в силу общности происхождения штаммов M, Res и T, их дифференциальная диагностика вызывала затруднения. Так, праймеры P1/PM, также как и моноклональные антитела AL, разработанные для специфического определения PPV-M, распознают также изоляты штаммов Res и T. Вплоть до открытия этих двух последних штаммов все изоляты, распознававшиеся праймерами P1/PM и антителами AL, считались относящимися к штамму M, что, как обнаружилось впоследствии, часто не соответствовало действительности. Для решения этой проблемы разработаны несколько подходов. Для идентификации изолятов PPV-Res были разработаны праймеры mD5 и mM3, таргетирующие, соответственно, последовательности (Cter)NIb до брейкпойнта в позиции 8450, и (Nter)CP после брейкпойнта (Subr et al., 2004). Другой подход основан на амплификации и последующем секвенировании центрального участка генома, именно последовательности (Cter)P3-6K1-(Nter)CI (Glasa et al., 2002b). Филогенетический анализ

полученной последовательности длиной 836 пн позволяет четко различать штаммы D, M, Res и T (Gurcan et al., 2019; Teber et al., 2019). Еще один прием основан на секвенировании гена БО, последовательности (Cter)NIb-CP-3'-NCR или более короткого участка генома, включающего гипервариабельную N-терминальную последовательность гена БО. Последующий филогенетический анализ полученных последовательностей обычно позволяет определить штаммовую принадлежность вирусного изолята.

Для определения штаммов D, M, C, EA и W разработаны также протоколы ПЦР в реальном времени, основанные как на специфической (TaqMan), так и на неспецифической (SYBR Green I) системе детекции (Varga & James, 2005; Varga & James, 2006b; Capote et al., 2006; EPPO, 2012).

Вместе с тем, учитывая высокую вероятность междуштаммовых РС в геномах PPV (раздел 2.3), самым надежным методом определения штамма вирусного изолята является секвенирование его полного генома.

### **3. Материалы и методы.**

#### **3.1. Поиск, сбор и хранение образцов.**

Поиск зараженных PPV растений осуществляли в различных типах насаждений косточковых культур (Табл. 1), отдавая предпочтение обследованию старых сортовых коллекций, которые были сформированы еще в те годы, когда зараженности вирусами не придавалось должного значения и отсутствовали средства массовой лабораторной диагностики фитовирусов. Такие насаждения с высокой вероятностью могли быть заражены редкими, уникальными, реликтовыми изолятами вируса.

Образцы листьев с симптомами инфекции (Рис. 1) собирали в течение 2009 - 2018 годов в: (i) сортовых коллекциях и сортоиспытательных участках Никитского ботанического сада – Национального научного центра РАН (НБС), Республика Крым; Всероссийского института растениеводства имени Н.И. Вавилова (ВИР), г. Санкт-Петербург; Татарского НИИ сельского хозяйства (НИИСХ), г. Казань; Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (МГУ), г. Москва; ВНИИ генетики и селекции плодовых растений имени И.В. Мичурина (ВНИИГСПР), г. Мичуринск Тамбовской области; (ii) ботанической коллекции косточковых Главного ботанического сада имени Н.В. Цицина РАН (ГБС), г. Москва; (iii) плодоносящих садах сливы в Ставропольском крае и Республике Дагестан; (iv) на дачных участках в Ленинградской, Тверской, Московской, Владимирской областях, Ставропольском крае и Республике Татарстан; (v) дикорастущих деревьях в г. Москве, Московской, Белгородской, Липецкой областях и Республике Крым. В ряде регионов сбор образцов осуществляли вместе с сотрудниками ФГБУ "Всероссийский центр карантина растений" Россельхознадзора РФ (ВНИИКР).

Листья собирали с деревьев (кустов) разного возраста и/или с корневой поросли, к образованию которой склонны многие виды косточковых культур, и хранили в холодильнике в запаянном полиэтиленовом пакете не более 10 дней с момента сбора. В течение этого времени их использовали для диагностики PPV с помощью ИФА и для экстракции тотальной РНК. Для обеспечения дальнейшей работы с вирусными изолятами оставшиеся листья лиофилизировали. С этой целью их измельчали ножницами и расфасовывали в пенициллиновые флаконы по 500 - 800 мг листовой ткани в каждый. Перед работой со следующим образцом ножницы промывали детергентом 7X (MP Biomedicals LLC, Франция), высушивали, протирали спиртом и прожигали. Заполненные и снабженные этикетками флаконы накрывали специальными пробками с прорезями для доступа воздуха, замораживали при  $-70^{\circ}\text{C}$  в Ultra Low Temperature Freezer U410 (New Brunswick Scientific, США), помещали в камеру лиофильной сушки Hetosicc CD52 (Heto Lab Equipment AS, Дания) и высушивали из замороженного состояния 2 суток. По истечении этого времени

флаконы извлекали, немедленно герметично закрывали пробками и хранили при +4°C до использования.

### **3.2. Иммуноферментный анализ.**

Для детекции PPV в собранных образцах и определения штамма вируса использовали сэндвич-вариант ИФА (double antibody sandwich ELISA, DAS-ELISA) и непрямой сэндвич-вариант ИФА (triple antibody sandwich ELISA, TAS-ELISA).

DAS-ELISA выполняли с помощью наборов Reagent set SRA 31505 (Agdia, США). Эти наборы комплектуются кроличьими антителами к PPV, которые выявляют все известные штаммы вируса. В лунки полистироловых планшетов (F96 MaxiSorp Nunc-Immuno plate, Nunc, Дания) вносили антитела к PPV, разведенные 1:200 0,05 М карбонатно-бикарбонатным буфером pH 9,6, и инкубировали ночь при +4°C. Планшеты промывали 5 раз PBS (0,14 М NaCl, 0,01 М калий-натрий фосфатный буфер, pH 7,2 - 7,4), содержащим 0,1% Твин 20, и вносили в лунки экстракты, приготовленные путем растирания листовой ткани в экстрагирующем буфере (PBS, 2% поливинилпирролидон (мол. м. 40 кДа) (SigmaAldrich, США), 0,5% Тритон X-100 (MP Biomedicals, Франция), 0,1% Твин 20 (MP Biomedicals, Франция), 0,02% азид натрия) в соотношении 1:20 (г/мл). Для растирания использовали керамические ступку и пестик или гомогенизатор MagNA Lyzer (Roche, Германия). Экстракты осветляли на настольной центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) 2,5 мин. Осветленные экстракты инкубировали 2 ч при 37°C на термостатируемом шейкере Shaker ST-3 (ELMI, Латвия) при скорости 400 об/мин. Планшеты промывали как описано выше и вносили конъюгат антител со щелочной фосфатазой, разведенный 1:200 буфером RUB3, входящим в состав набора. Инкубировали 1 ч на шейкере при 37°C, промывали планшеты и вносили в лунки субстрат (1 мг/мл п-нитрофенилфосфат в 10% диэтаноламин хлориде, 0,005 М MgCl<sub>2</sub>, pH 9,8). Через 30 мин инкубации при 37°C определяли оптическую плотность продукта ферментативной реакции при длине волны 405 нм на считывающем устройстве Titerteck Multiscan (Eflab, Финляндия). Положительной реакцией считали такую, при которой сигнал в лунке с анализируемым образцом больше чем втрое превышал сигнал в отрицательном контроле. Отрицательным контролем служили экстракты из листьев соответствующих косточковых культур, не зараженных PPV. В качестве положительного контроля вначале использовали лиофилизированные экстракты, входящие в состав наборов для TAS-ELISA (см. ниже), а затем изоляты вируса из коллекции нашей лаборатории.

TAS-ELISA выполняли с помощью наборов K-10B, K-11B, K-12B и K-14B (Agritest S.r.l., Италия), в которых, соответственно, используются мышинные моноклональные антитела 5B, AL, 4DG5 и AC, распознающие любые изоляты вируса (5B) или изоляты штаммов M (AL), D (4DG5) и C (AC). В лунки полистироловых планшетов (F96 MaxiSorp

Nunc-Immuno plate) вносили поликлональные кроличьи антитела к РРV (входящие в состав наборов) в 0,05 М карбонатно-бикарбонатном буфере рН 9,6, и инкубировали ночь при +4°C. Анализируемые экстракты готовили и инкубировали, как описано для DAS-ELISA. После промывания планшетов в лунки вносили те или иные моноклональные антитела, разведенные в PBS-0,1% Твин 20, и инкубировали 2 ч на шейкере при 37°C. Связавшиеся моноклональные антитела выявляли с помощью конъюгата - козьих антител к IgG мыши, меченных щелочной фосфатазой; инкубировали 2 ч при 37°C. Процессы инкубации с субстратом и оценки результатов ИФА описаны в предыдущем абзаце.

### **3.3. Получение геномной РНК РРV.**

Для иммуносорбции вирусных частиц в микроцентрифужную пробирку (Multiply-Pro cup 0.5 mL, кат. № 72.735.002, Sarstedt, Германия) вносили 100 мкл кроличьих антител к РРV из набора Reagent set SRA 31505 (Agdia), разведенных 1:200 0,05 М карбонатно-бикарбонатным буфером рН 9,6, и инкубировали ночь при +4°C. На следующий день пробирки трижды промывали PBS с 0,05% Твин 20. Для приготовления экстрактов навеску листовой ткани (50 мг лиофилизированных или 100 мг свежих листьев) растирали в ступке в 2 мл экстрагирующего буфера (PBS, 0,2% диэтилдитиокарбамат натрия (Merck, Германия), 2% поливинилпирролидон (мол. м. 10 кДа) (Sigma). В промытые пробирки вносили по 100 мкл экстракта, осветленного 3 мин на центрифуге MiniSpin. Инкубировали 1 ч при 37°C в твердотельном настольном термостате «Термит» (ДНК-Технология, Россия). По окончании инкубации пробирки трижды промывали PBS с 0,05% Твин-20. Для разрушения вирусных частиц, связавшихся с антителами, в пробирки вносили 10 мкл 1% Тритона X-100, нагретого до 70°C. Пробирки выдерживали в твердотельном настольном термостате «Гном» (ДНК-Технология, Россия) 10 мин при 70°C, периодически встряхивая содержимое на вортексе Combi-Spin FVL-2400 (BioSan, Латвия), после чего немедленно охлаждали в ледяной бане. Полученный тритоновый элюат содержал геномную РНК РРV.

### **3.4. Получение тотальной РНК.**

Тотальную РНК из листьев анализируемых растений получали с помощью наборов RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Германия). Для лизиса растительной ткани использовали буфер RLT на основе гуанидинтиоцианата, входящий в состав набора. Экстракты осветляли 5 мин на центрифуге MiniSpin. Дальнейшие операции (преципитацию РНК этанолом, внесение образца в спин-колонку, промывание колонки буферами RW1 и RPE) осуществляли в соответствии с протоколом фирмы. РНК, связавшуюся с силикагелевой мембраной, элюировали 40 мкл воды, не содержащей рибонуклеаз. Спектральные характеристики и количество выделенной РНК определяли на спектрофотометре Ultrospec 1100 *pro* (Amersham Biosciences, Великобритания).



Таблица 1. Перечень изолятов вируса оспы сливы (PPV), собранных и исследованных в данной работе.

№ п/п	Название изолята	Место сбора образца	Тип насаждения <sup>1)</sup>	Растение-хозяин рода <i>Prunus</i>	Штамм вируса	Секвенированный регион генома <sup>2)</sup>	Номер последовательности в GenBank
1	1410	г. Москва	Ботаническая коллекция косточковых ГБС	<i>P. nigra</i>	W	(Cter)NIb-CP-3'NCR	HQ326086
2	1410-1	г. Москва	Ботаническая коллекция косточковых ГБС	<i>P. nigra</i>	W	(Cter)NIb-(Nter)CP	JN251107
						Полный геном	HG916863
3	1410-6	г. Москва	Ботаническая коллекция косточковых ГБС	<i>P. nigra</i>	W	н/с	
4	1410-7	г. Москва	Ботаническая коллекция косточковых ГБС	<i>P. nigra</i>	W	(Cter)NIb-(Nter)CP	JN251108
						Полный геном	HG916862
5	1410-7/1	г. Москва	Ботаническая коллекция косточковых ГБС	<i>P. nigra</i>	W	(Cter)NIb-(Nter)CP	
6	1410-7/2	г. Москва	Ботаническая коллекция косточковых ГБС	<i>P. nigra</i>	W	(Cter)NIb-(Nter)CP	
7	1410-12	г. Москва	Ботаническая коллекция косточковых ГБС	<i>P. nigra</i>	W	(Cter)NIb-(Nter)CP	JN251109
8	Pd6	г. Москва	Ботаническая коллекция косточковых ГБС	<i>P. nigra</i>	W	н/с	
9	pPN1	г. Москва	Ботаническая коллекция косточковых ГБС	<i>P. nigra</i>	W	н/с	
10	pPN2	г. Москва	Ботаническая коллекция косточковых ГБС	<i>P. nigra</i>	W	н/с	
11	Pd1	г. Москва	Ботаническая коллекция косточковых ГБС	<i>P. spinosa</i>	W	(Cter)NIb-(Nter)CP	JN251110
12	Pd2	г. Москва	Ботаническая коллекция косточковых ГБС	<i>P. spinosa</i>	W	(Cter)NIb-(Nter)CP	JN251111
						Полный геном	HG916859
13	Pd3	г. Москва	Ботаническая коллекция косточковых ГБС	<i>P. spinosa</i>	W	(Cter)NIb-(Nter)CP	JN251112

14	Pd4	г. Москва	Ботаническая коллекция косточковых ГБС	<i>P. spinosa</i>	W	(Cter)NIb-(Nter)CP	JN251113
15	Pd5	г. Москва	Ботаническая коллекция косточковых ГБС	<i>P. spinosa</i>	W	(Cter)NIb-(Nter)CP	JN251114
16	Avang	г. Москва	Дикорастущее дерево	<i>P. domestica</i>	W	CP	KU359729
17	Kp2U	г. Москва	Дикорастущее дерево	<i>P. domestica</i>	W	CP	KU359731
18	Pulk	г. Москва	Дикорастущее дерево	<i>P. domestica</i>	W	CP	KU359732
19	Pulk1	г. Москва	Дикорастущее дерево	<i>P. domestica</i>	W	CP	KU359733
20	STNB1	Московская область	Дачный участок	<i>P. domestica</i>	W	(Cter)NIb-(Nter)CP	JN251116
						Полный геном	HG916857
21	STNB2	Московская область	Дачный участок	<i>P. domestica</i>	W	(Cter)NIb-(Nter)CP	JN251117
						Полный геном	HG916858
22	Karm	Московская область	Дикорастущее дерево	<i>P. domestica</i>	W	CP	KU359730
23	RD4	Московская область	Дачный участок	<i>P. tomentosa</i>	W	(Cter)NIb-(Nter)CP	JN226148
						Полный геном	HG916856
24	Pk	Тверская область	Дачный участок	<i>P. domestica</i>	W	(Cter)NIb-CP-3'NCR	JQ970440
						Полный геном	KC347608
25	Pk1	Тверская область	Дачный участок	<i>P. domestica</i>	W	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
26	Pk2	Тверская область	Дачный участок	<i>P. domestica</i>	W	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
27	Pk5	Тверская область	Дачный участок	<i>P. domestica</i>	W	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
28	Pk9	Тверская область	Дачный участок	<i>P. domestica</i>	W	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
29	Vlad4	Владимирская область	Дачный участок	<i>P. domestica</i>	W	CP	KU359734
30	BY	Белгородская область	Дикорастущее дерево	<i>P. domestica</i>	W	(Cter)NIb-CP-3'NCR	JQ970438
31	P1	Ставропольский край	Плодоносящий сад	<i>P. domestica</i>	W	(Cter)NIb-CP-3'NCR	JQ970439
32	P2	Ставропольский край	Плодоносящий сад	<i>P. domestica</i>	W	(Cter)NIb-(Nter)CP	JN900467

33	P2-1	Ставропольский край	Плодоносящий сад	<i>P. domestica</i>	W	Полный геном	HG916860
34	P2-2	Ставропольский край	Плодоносящий сад	<i>P. domestica</i>	W	Полный геном	LN852400
35	P3	Ставропольский край	Плодоносящий сад	<i>P. domestica</i>	W	(Cter)Nlb-(Nter)CP	JN900468
						Полный геном	HG916861
36	Fl-3	г. Москва	Дикорастущее дерево	<i>P. cerasus</i>	CR	CP	JX472437
						Полный геном	MG736812
37	Kp8-1	г. Москва	Дикорастущее дерево	<i>P. cerasus</i>	CR	CP	JX472432
						Полный геном	MG736813
38	Kp8-2U	г. Москва	Дикорастущее дерево	<i>P. cerasus</i>	CR	CP	JX472435
						Полный геном	MG736814
39	Pul-1	г. Москва	Дикорастущее дерево	<i>P. cerasus</i>	CR	CP	JX472438
						Полный геном	MG736815
40	Pul-DS	г. Москва	Дикорастущее дерево	<i>P. cerasus</i>	CR	CP	JX472436
						Полный геном	MG736816
41	Kp8-2D	г. Москва	Дикорастущее дерево	<i>P. cerasus</i>	CR	CP	JX472434
42	Kp8-1U	г. Москва	Дикорастущее дерево	<i>P. cerasus</i>	CR	CP	JX472433
43	Fl-1	г. Москва	Дикорастущее дерево	<i>P. cerasus</i>	CR	CP	JX472439
44	Fl-2	г. Москва	Дикорастущее дерево	<i>P. cerasus</i>	CR	CP	JX472440
45	K28	Республика Крым	Дикорастущее дерево	<i>P. cerasifera</i>	Rec	Полный геном	KF472134
46	Kisl-1pl	Ставропольский край	Дачный участок	<i>P. domestica</i>	Rec	(Cter)Nlb-(Nter)CP	KF992254
						Полный геном	KM273015
47	Kisl-2pl	Ставропольский край	Дачный участок	<i>P. domestica</i>	Rec	(Cter)Nlb-(Nter)CP	
48	Kisl-3pl	Ставропольский край	Дачный участок	<i>P. domestica</i>	Rec	(Cter)Nlb-(Nter)CP	
49	Kobr3pl	Ленинградская область	Дачный участок	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)Nlb-CP-3'NCR	

50	Kobr4pl	Ленинградская область	Дачный участок	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
51	Kobr5pl	Ленинградская область	Дачный участок	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
52	Kobr8pl	Ленинградская область	Дачный участок	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KP198590
53	Kobr11pl	Ленинградская область	Дачный участок	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
54	Kobr15pl	Ленинградская область	Дачный участок	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KP198591
55	Kobr16pl	Ленинградская область	Дачный участок	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
56	Kobr17pl	Ленинградская область	Дачный участок	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
57	Kobr18pl	Ленинградская область	Дачный участок	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
58	Kobr19myr	Ленинградская область	Дачный участок	<i>P. cerasifera</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
59	Pav1pl	Ленинградская область	Сортовая коллекция косточковых ВИР	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
60	Pav2pl	Ленинградская область	Сортовая коллекция косточковых ВИР	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
61	Pav3pl	Ленинградская область	Сортовая коллекция косточковых ВИР	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
62	Pav4pl	Ленинградская область	Сортовая коллекция косточковых ВИР	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
63	Pav5pl	Ленинградская область	Сортовая коллекция косточковых ВИР	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
64	Pav6a	Ленинградская область	Сортовая коллекция косточковых ВИР	<i>P. cerasifera</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KP198596
65	Pav7myr	Ленинградская область	Сортовая коллекция косточковых ВИР	<i>P. cerasifera</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	

66	Pav8myr	Ленинградская область	Сортовая коллекция косточковых ВИР	<i>P. cerasifera</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
67	Pav12pl	Ленинградская область	Сортовая коллекция косточковых ВИР	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
68	Pav13pl	Ленинградская область	Сортовая коллекция косточковых ВИР	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
69	Pav15myr	Ленинградская область	Сортовая коллекция косточковых ВИР	<i>P. cerasifera</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
70	Pav16pl	Ленинградская область	Сортовая коллекция косточковых ВИР	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
71	Pav17	Ленинградская область	Сортовая коллекция косточковых ВИР	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KP198597
72	Pav18	Ленинградская область	Сортовая коллекция косточковых ВИР	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
73	Pav20	Ленинградская область	Сортовая коллекция косточковых ВИР	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
74	Pav21	Ленинградская область	Сортовая коллекция косточковых ВИР	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KP198598
75	Lukh	Московская область	Дачный участок	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KP198592
76	RD1	Московская область	Дачный участок	<i>P. tomentosa</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KP198599
77	RD2	Московская область	Дачный участок	<i>P. tomentosa</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KP198600
78	RD5	Московская область	Дачный участок	<i>P. tomentosa</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KP198601
79	STNC	Московская область	Дачный участок	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KP198602
80	M11	г. Мичуринск	Коллекция ВНИИГ и СПР	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
81	M15	г. Мичуринск	Коллекция ВНИИГ и СПР	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
82	M17	г. Мичуринск	Коллекция ВНИИГ и СПР	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KP198593

83	M18	г. Мичуринск	Коллекция ВНИИГ и СПР	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
84	M20	г. Мичуринск	Коллекция ВНИИГ и СПР	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KP198594
85	M23	г. Мичуринск	Коллекция ВНИИГ и СПР	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	
86	LipK-205	Липецкая область	Дикорастущее дерево	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KR028389
87	P10	Ставропольский край	Плодоносящий сад	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KP198595
88	K9	Республика Крым	Сортовая коллекция косточковых НБС	<i>P. persica</i>	D	Полный геном	KR006729
89	K10	Республика Крым	Сортовая коллекция косточковых НБС	<i>P. persica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KP198585
90	K11	Республика Крым	Дикорастущее дерево	<i>P. persica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KP198586
91	K17	Республика Крым	Сортовая коллекция косточковых НБС	<i>P. persica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KP198587
92	K18	Республика Крым	Сортовая коллекция косточковых НБС	<i>P. persica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KP198588
93	K22	Республика Крым	Сортовая коллекция косточковых НБС	<i>P. domestica</i>	D	Полный геном	KR006730
94	K24	Республика Крым	Сортовая коллекция косточковых НБС	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KP198589
95	K27	Республика Крым	Сортовая коллекция косточковых НБС	<i>P. cerasifera</i>	D	Полный геном	KR028387
96	Cr11	Республика Крым	Сортовая коллекция косточковых НБС	<i>P. persica</i>	D	Полный геном	KR028385
97	Cr15	Республика Крым	Сортовая коллекция косточковых НБС	<i>P. persica</i> var. nectarine	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KP198583
98	Cr16	Республика Крым	Сортовая коллекция косточковых НБС	<i>P. persica</i> var. nectarine	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KP198584
99	Cr35	Республика Крым	Сортовая коллекция косточковых НБС	<i>P. persica</i> var. nectarine	D	Полный геном	KR028386

100	Fav-1ph	Республика Крым	Сортовая коллекция косточковых НБС	<i>P. persica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KX119438
101	RC-1ph	Республика Крым	Сортовая коллекция косточковых НБС	<i>P. persica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KX119439
102	AL-G	Республика Крым	Дикорастущее дерево	<i>P. cerasifera</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KX119433
103	AL-M	Республика Крым	Дикорастущее дерево	<i>P. cerasifera</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KX119434
104	AL-N	Республика Крым	Дикорастущее дерево	<i>P. cerasifera</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KX119435
105	AL-T	Республика Крым	Дикорастущее дерево	<i>P. cerasifera</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KX119436
106	AL-R	Республика Крым	Дикорастущее дерево	<i>P. cerasifera</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KX119437
107	BAL	Республика Крым	Дикорастущее дерево	<i>P. cerasifera</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	MN734793
108	Lav	Республика Крым	Дикорастущее дерево	<i>P. cerasifera</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	MN734798
109	N1	Республика Крым	Дикорастущее дерево	<i>P. cerasifera</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	MN734801
110	Lad	Республика Крым	Дикорастущее дерево	<i>P. cerasifera</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	MN734797
111	Spa	Республика Крым	Дикорастущее дерево	<i>P. cerasifera</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	MN734803
112	MN	Республика Крым	Дикорастущее дерево	<i>P. cerasifera</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	MN734800
113	MM	Республика Крым	Дикорастущее дерево	<i>P. cerasifera</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	MN734799
114	AU	Республика Крым	Сортовая коллекция косточковых НБС	<i>P. armeniaca</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	MN734792
115	Ki	Республика Крым	Сортовая коллекция косточковых НБС	<i>P. armeniaca</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	MN734796
116	35ph	Республика Крым	Сортовая коллекция косточковых НБС	<i>P. persica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	MN734789
117	AL-2	Республика Крым	Дикорастущее дерево	<i>P. cerasifera</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	MN734790
118	Ph	Республика Крым	Сортовая коллекция косточковых НБС	<i>P. persica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	MN734802
119	Co1	Республика Крым	Сортовая коллекция косточковых НБС	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	MN734794
120	D-011	Республика Дагестан	Плодоносящий сад	<i>P. domestica</i>	D	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KR028388

121	H23	Республика Крым	Сортовая коллекция косточковых НБС	<i>P. armeniaca</i>	M	(Cter)NIb-CP-3'NCR	MN734795
122	Tat-2	Республика Татарстан	Заброшенная коллекция вишни Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	CV	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KX685593
						Полный геном	MF447179
123	Tat-4	Республика Татарстан	Заброшенная коллекция вишни Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	CV	(Cter)NIb-CP-3'NCR	KX685595
						Полный геном	MF447180
124	Tat-36	Республика Татарстан	Дикорастущее дерево	<i>P. cerasus</i>	CV	CP	MF447181
125	Tat-39	Республика Татарстан	Заброшенная коллекция вишни Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	CV	CP	MF447182
126	Tat-40	Республика Татарстан	Заброшенная коллекция вишни Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	CV	CP	MF447183
127	Bg6	г. Москва	Сортовая коллекция вишни Ботанического сада МГУ	<i>P. cerasus</i>	C	Полный геном	MN311853
128	Bg10	г. Москва	Сортовая коллекция вишни Ботанического сада МГУ	<i>P. cerasus</i>	C	CP	MN346284
129	Bg26	г. Москва	Сортовая коллекция вишни Ботанического сада МГУ	<i>P. cerasus</i>	C	Полный геном	MN311854
130	Bg60	г. Москва	Сортовая коллекция вишни Ботанического сада МГУ	<i>P. cerasus</i>	C	CP	MN346285
131	Bg66	г. Москва	Сортовая коллекция вишни Ботанического сада МГУ	<i>P. cerasus</i>	C	Полный геном	MN311855
132	Pul	г. Москва	Дикорастущее дерево	<i>P. cerasus</i>	C	Полный геном	MN311856
133	Pav2	Ленинградская область	Сортовая коллекция вишни Павловской опытной станции ВИР	<i>P. cerasus</i>	C	(Cter)NIb-CP-3'NCR	MN346312
134	Pav3	Ленинградская область	Сортовая коллекция вишни Павловской опытной станции ВИР	<i>P. cerasus</i>	C	(Cter)NIb-CP-3'NCR	MN346313
135	Pav5	Ленинградская область	Сортовая коллекция вишни Павловской станции ВИР	<i>P. cerasus</i>	C	(Cter)NIb-CP-3'NCR	MN346314



136	Рав67	Ленинградская область	Сортовая коллекция вишни Павловской опытной станции ВИР	<i>P. cerasus</i>	С	(Cter)NIb-CP-3'NCR	МН346316
137	Рав8	Ленинградская область	Сортовая коллекция вишни Павловской опытной станции ВИР	<i>P. cerasus</i>	С	(Cter)NIb-CP-3'NCR	МН346315
138	Ка1	Республика Татарстан	Сортоиспытательный участок Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	CP	МН346286
139	Ка5	Республика Татарстан	Сортоиспытательный участок Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	CP	МН346287
140	Ка7	Республика Татарстан	Сортоиспытательный участок Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	Полный геном	МН311857
141	Ка10	Республика Татарстан	Сортоиспытательный участок Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	CP	МН346288
142	Ка11	Республика Татарстан	Сортоиспытательный участок Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	CP	МН346289
143	Ка12	Республика Татарстан	Сортоиспытательный участок Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	CP	МН346290
144	Ка13	Республика Татарстан	Сортоиспытательный участок Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	CP	МН346291
145	Ка15	Республика Татарстан	Сортоиспытательный участок Татарского НИИСХ	<i>P. tomentosa</i>	С	Полный геном	МН311858
146	Ка16	Республика Татарстан	Сортоиспытательный участок Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	CP	МН346292
147	Ка19	Республика Татарстан	Сортоиспытательный участок Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	CP	МН346293
148	Ка20	Республика Татарстан	Сортоиспытательный участок Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	CP	МН346294
149	Ка21	Республика Татарстан	Сортоиспытательный участок Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	CP	МН346295

150	Ка22	Республика Татарстан	Сортоиспытательный участок Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	СР	МН346296
151	Ка23	Республика Татарстан	Сортоиспытательный участок Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	Полный геном	МН311859
152	Ка24	Республика Татарстан	Сортоиспытательный участок Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	СР	МН346297
153	Ка27	Республика Татарстан	Сортоиспытательный участок Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	СР	МН346298
154	Ка28	Республика Татарстан	Сортоиспытательный участок Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	СР	МН346299
155	Ка31	Республика Татарстан	Сортоиспытательный участок Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	СР	МН346300
156	Ка36	Республика Татарстан	Дачный участок	<i>P. cerasus</i>	С	СР	МН346301
157	Ка42	Республика Татарстан	Сортоиспытательный участок Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	СР	МН346302
158	Ка43	Республика Татарстан	Сортоиспытательный участок Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	СР	МН346303
159	Ка44	Республика Татарстан	Сортоиспытательный участок Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	СР	МН346304
160	Ка45	Республика Татарстан	Сортоиспытательный участок Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	СР	МН346305
161	Ка54	Республика Татарстан	Заброшенный гибридный сад вишни Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	СР	МН346306
162	Ка55	Республика Татарстан	Заброшенный гибридный сад вишни Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	СР	МН346307
163	Ка57	Республика Татарстан	Заброшенный гибридный сад вишни Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	СР	МН346309

164	Ка58	Республика Татарстан	Заброшенный гибридный сад вишни Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	СР	МН346310
165	Ка56	Республика Татарстан	Заброшенный гибридный сад вишни Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	СР	МН346308
166	Ка62	Республика Татарстан	Заброшенная коллекция вишни Татарского НИИСХ	<i>P. cerasus</i>	С	СР	МН346311

1) ГБС – Главный ботанический сад имени Н.В. Цицина РАН, г. Москва; НБС – Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН, г. Ялта, Республика Крым; ВИР – Всероссийский институт растениеводства имени Н.И. Вавилова, г. Санкт-Петербург; НИИСХ – Татарский НИИ сельского хозяйства, г. Казань; МГУ – Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва. ВНИИГ и СПР - ВНИИ генетики и селекции плодовых растений имени И.В. Мичурина, г. Мичуринск Тамбовской области;

2) СР – белок оболочки; участок генома (Сter)NІb- (Nter)СР включает С-терминальный фрагмент гена NІb и N-терминальный фрагмент гена белка оболочки; (Сter)NІb-СР-3'NCR включает С-терминальный фрагмент гена NІb - ген белка оболочки и часть 3'-концевой некодирующей последовательности.

н/с - не секвенировали.

Пустая ячейка в крайнем правом столбце означает, что последовательность не депонировали в GenBank.

### **3.5. Обратная транскрипция.**

Обратную транскрипцию (ОТ) на матрице геномной РНК вируса или тотальной РНК осуществляли с рассеянной затравки (dN6, Евроген, Россия), олиго-dT<sub>20</sub>-праймера (специфичного к поли-А-последовательности на 3'-конце вирусной РНК) или с обратного (антисмыслового) праймера. В тонкостенные микроцентрифужные пробирки (SnapSeal Graduated Microtubes, SSIbio, США) вносили по 2 мкл (20 pmol) олигонуклеотидного праймера и добавляли 5 мкл тритонового элюата или тотальной РНК. Для отжига праймера смесь инкубировали в термостате "Гном" 5 мин при 65°C. По окончании инкубации пробирки помещали в ледяную баню, сбрасывали капли и добавляли смесь для ОТ. Для ее приготовления смешивали (на 1 реакцию): 4,5 мкл воды (Water, nuclease-free, Thermo Scientific), 4 мкл 5x буфера для обратной транскриптазы MMLV (Евроген), 2 мкл 10 мМ смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTP), 2 мкл дитиотрейтола (Евроген), ингибитор рибонуклеаз (0,5 мкл RiboLock, 40 ед/мкл, Thermo Scientific) и 1 мкл обратной транскриптазы MMLV (Евроген). В ряде случаев использовали обратные транскриптазы других фирм: AMV (Fermentas, Литва), ImProm II (Promega, США) и SuperScript II (Invitrogen, США). Реакцию проводили в термостате «Термит» 60 мин при 37°C (или 42°C для других ревертаз). По окончании реакции пробирки помещали в термостат "Гном" на 10 мин для инактивации фермента при 70°C, затем в ледяную баню.

### **3.6. Полимеразная цепная реакция.**

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) для диагностики РРV выполняли в объеме 25 мкл. С этой целью 2 мкл кДНК, синтезированной в реакции ОТ, смешивали с ПЦР-смесью, состоящей из (на 1 реакцию): 16,5 воды MilliQ, 2,5 мкл 10x буфера для Taq ДНК-полимеразы (Евроген), 0,5 мкл смеси 10 мМ dNTP, 2 мкл 25 мМ MgCl<sub>2</sub>; по 0,5 мкл прямого и обратного праймеров (10 пМ/мкл), 0,5 мкл Taq ДНК-полимеразы (PK113L, Евроген). Для предотвращения испарения сверху наслаивали минеральное масло. ПЦР осуществляли на амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технология, Россия). ПЦР включала денатурацию образца (94°C, 3 мин), 30 - 35 циклов амплификации, достройку полинуклеотидной цепи 5 - 10 мин при 72°C и хранение при 4°C. Продукты ПЦР, предназначенные для секвенирования, получали аналогичным образом, но реакцию выполняли в объеме 50 мкл, с кратным увеличением объема всех компонентов реакционной смеси. Кроме того, для повышения точности копирования, в этом случае использовали ДНК-полимеразу Encyclo (Евроген). Температура отжига праймеров и время элонгации определялись характеристиками праймеров и длиной ожидаемого продукта ПЦР.

Анализ продуктов ПЦР осуществляли с помощью электрофореза в агарозном геле, приготовленном на 1х трис-ацетатном буфере (TAE, Thermo Scientific), в присутствии этидиумбромида. К 10 мкл образца добавляли 3 мкл красителя (6х DNA loading dye, Fermentas) и вносили образец в лунки. В качестве маркеров использовали фрагменты ДНК определенного размера (GeneRuler Plus 100 bp DNA ladder или GeneRuler Plus 1 kb DNA ladder, Fermentas). Электрофорез осуществляли при напряжении 80 В в течение 40 - 60 мин в приборе для горизонтального электрофореза SE-1 (Хеликон, Россия). Гели анализировали на трансиллюминаторе TFP-M/WL (Vilber Lourmat, Франция) при длине волны 312 нм и фотографировали с помощью гель-документирующей системы MultiDoc-It (UVP, Великобритания).

### **3.7. Вестерн-блот.**

Для приготовления проб для электрофореза в полиакриламидном геле навески листьев гомогенизировали в 2-х кратном буфере для нанесения образцов (0,1М Tris-HCl, pH 6,8, 4% додецилсульфат натрия, 20% глицерол, 5%  $\beta$ -меркаптоэтанол, 0,001% бромфеноловый синий) в соотношении 1:15 (г/мл). Экстракт осветляли 3 мин на центрифуге «MiniSpin». Супернатант (5 мкл) прогревали при 95°C 5 мин в термостате «Термит», сбрасывали капли и наносили на гель.

Электрофорез проводили в денатурирующих условиях (Laemmli, 1970), используя 3% верхний концентрирующий гель и 10% нижний разделяющий гель, с соотношением акриламид: N,N'-метиленбисакриламид 30:0,8 в обоих случаях. Электрофорез проводили в приборе «Mini-Protean Tetra System» (BioRad, США), в трис-глициновом буфере, pH 8,4 (25 mM Tris, 250 mM глицин, 0,1% додецилсульфат натрия) при постоянном токе 12 mA на один гель, используя источник питания "Эльф-4" (ДНК-Технология, Россия). После разделения белки переносили из полиакриламидного геля на мембрану Immobilon-P (Merck-Millipore, Германия) в трис-глициновом буфере без додецилсульфата натрия, но с 20% этанолом с помощью прибора Semi-Dry Transfer Cell (BioRad, США) при напряжении 15 В в течении 30 мин.

По завершении переноса мембрану инкубировали в 5% обезжиренном молоке (Fluka, Германия), растворенным в PBS. В качестве первых антител использовали моноклональные антитела 5В из набора К-10В (Agritest) в разведении 1:5000, а в качестве конъюгата - ослиные антитела к IgG мыши, меченные пероксидазой хрена (W4021, Promega, США), в разведении 1:20000. Для выявления на иммуноблоте мутантных форм БО, которые не распознаются антителами 5В, использовали кроличьи поликлональные антитела из набора

ELISA Reagent set (Agdia) и конъюгат - козы антитела к IgG кролика, меченные пероксидазой (НИИЭМ имени Н.Ф. Гамалеи) в разведении 1:20000. Инкубацию с обезжиренным молоком, антителами и конъюгатом проводили в чашках Петри диаметром 90 мм (Медполимер, Санкт-Петербург) на качалке Shaker S-3 (ELMI, Латвия) (60 об/мин) в течении 1 ч при комнатной температуре. После каждой инкубации мембрану промывали PBS с 0,1% Твин 20 трижды по 10 мин на качалке. Связавшийся с мембраной конъюгат выявляли с помощью хемилюминесцентной системы детекции ECL (Promega, США). Мембрану экспонировали с рентгеновской пленкой (RETINA, Германия) в течение 40 - 60 мин. Для обработки пленки использовали проявитель и фиксаж Kodak (США).

### **3.8. Определение 3'-концевых последовательностей генома.**

Продукты ПЦР, подлежащие секвенированию, разделяли с помощью электрофореза в 1 - 2% агарозном геле. По окончании электрофореза скальпелем вырезали зону нужного размера, освещая гель на трансиллюминаторе TFP-M/WL, и переносили вырезанные куски в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл. ДНК выделяли из агарозы на спин-колонках с помощью наборов Cleanup Standard (кат. № BC022, Евроген) в соответствии с протоколом фирмы. Очищенную ДНК секвенировали с прямого и с обратного праймеров методом Сэнгера в фирме Евроген. Характеристики праймеров и продуктов ПЦР, получаемых при их использовании, представлены в Таблице 2. Все праймеры, указанные в таблице, были синтезированы в фирме Евроген. Последовательности продуктов ПЦР собирали из перекрывающихся сиквенсов с помощью программ EditSeq и MegAlign (DNASTAR Lasergene, США).

### **3.9. Определение штамма вирусного изолята.**

Для определения штамма использовали метод TAS-ELISA с штаммспецифичными моноклональными антителами (раздел 3.2.) и/или иммуноспецифическую ОТ-ПЦР (Wetzel et al., 1992) с праймерами, специфичными к штаммам D, M (Olmos et al., 1997), C (Nemchinov et al., 1998; Szemes et al., 2001), Rec (Subr et al., 2004), W (James and Varga, 2004; Glasa et al., 2011), CR (Glasa et al., 2013) согласно оригинальным методикам. Праймеры для идентификации изолятов штамма CV и условия их применения были разработаны нами (раздел 3.2.5.2.). Характеристики штаммспецифичных праймеров и продуктов ПЦР, получаемых при их использовании, указаны в таблице 3. Все праймеры были синтезированы в фирме Евроген. Положительными контролями для ОТ-ПЦР служили изоляты соответствующего штамма вируса из коллекции нашей лаборатории. В качестве отрицательных контролей использовали растения косточковых культур, не зараженные PPV.

Кроме того, для определения штамма использовали метод филогенетического анализа 3'-концевых и полногеномных последовательностей вирусных изолятов (разделы 3.9 - 3.11).

### **3.10. Секвенирование полных геномов вирусных изолятов.**

Полногеномные последовательности вирусных изолятов определяли посредством HTS. Библиотеки кДНК получали на матрице геномной РНК РРV (раздел 3.3) с помощью набора Whole Amplification Kit (WTA2, Sigma-Aldrich, США), в соответствии с инструкцией к набору.

HTS библиотек кДНК изолятов Tat-2, Tat-4, Ka7, Ka15 и Ka23 выполняли на платформе Illumina с использованием геномного секвенатора MiSeq в Центре коллективного пользования в области геномики Сколковского института науки и технологий. Прочтения собирали в контиги de novo с помощью программы SPAdes v.3.10.1 (Bankevich et al., 2012) при содействии В. А. Наумова. РРV-релевантные контиги идентифицировали с помощью программы BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и выравнивали на один из референсных геномов с максимальной степенью идентичности последовательностей.

HTS библиотек кДНК изолятов Fl-3, Kp8-1, Kp8-2U, Pul-1, Pul-DS, K28, Kisl-1pl, K9, K22, K27, Cr11, Cr35, Bg6, Bg26, Bg66 и Pul выполняли на платформе 454 с использованием геномного секвенатора GS Junior (Roche Diagnostics Rus LLC, Россия) и его программного обеспечения в Институте молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН. Прочтения собирали в контиги выравниванием на референсном изоляте соответствующего штамма, в качестве которого использовали полногеномные последовательности изолятов Fantasia (AY912056, штамм D), BY181 (HQ840518, штамм C) и BOR-3 (AY028309, штамм Rec). Прочтения изолятов штамма CR выравнивали на референсном изоляте штамма C (BY181). Сборку осуществляли с помощью GS Reference Mapper program (v.2.7) из программного обеспечения геномного секвенатора. Пробелы между контигами секвенировали методом Сэнгера с помощью специально синтезированных праймеров, фланкирующих пробел, а 5'-терминальные последовательности геномов - с помощью наборов для быстрой амплификации концов кДНК (5'-RACE, Invitrogen, США) согласно протоколу производителя. Праймеры синтезировали в фирме Евроген, там же секвенировали получаемые продукты ПЦР.

Полные геномы изолятов штамма W 1410-1, 1410-7, Pd2, STNB1, STNB2, P2-1, P2-2, P3 и RD4 секвенировали в Centre for Plant Health-Sidney Laboratory, Canadian Food Inspection Agency, North Saanich, British Columbia, Канада. Для выполнения этой работы из растений, зараженных соответствующими изолятами, нами была выделена тотальная РНК с помощью наборов RNeasy Plant Mini Kit. Колонки, высушенные после промывания буфером RPE,

высылали в Канаду, где РНК элюировали и использовали для получения продуктов ПЦР с их последующим клонированием и секвенированием по Сэнгеру.

### **3.11. Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей.**

Нуклеотидные и предсказанные аминокислотные последовательности выравнивали с помощью программы ClustalW v.2.1 (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>) или используя старую версию программы, встроенную в пакет BioEdit (Hall, 1999). Полученные выравнивания использовали для определения степени идентичности/дивергенции последовательностей, их филогенетического и рекомбинационного анализа. Филогенетический анализ выполняли с помощью программы MEGA7 (Kumar et al., 2016), используя методы присоединения соседей (neighbor joining) или максимального правдоподобия (maximum likelihood) и эволюционные модели Kimura-2 или Tajima-Nei, соответственно, с бутстрэпом из 1000 случайных выборок. Рекомбинационный анализ выполняли с помощью программы Recombination Detection Program (RDP) v. 4.64 (Martin et al., 2015) или более старых версий программы, используя установки по умолчанию, за исключением того, что выбирали опции "sequences are linear" и "list events detected by >5 methods".

### **3.12. Изучение переноса PPV через семена косточковых культур.**

Собирали спелые плоды с зараженных деревьев сливы или вишни. Косточки отделяли от мякоти, обрабатывали раствором марганцовокислого калия и стратифицировали во влажном субстрате в течение 5–6 мес при температуре 2 – 4°C до прорастания семян. Проросшие семена высаживали в стерильный почвенный субстрат в горшки и выращивали сеянцы при естественном освещении и комнатной температуре в условиях, исключающих присутствие тлей. Наличие вируса в листьях сеянцев определяли визуально (по характерным симптомам шарки), с помощью DAS-ELISA (раздел 3.2) или ОТ-ПЦР с праймерами P1/P2 (Табл. 3) через 5 – 7 недель после их высаживания в горшки, используя в качестве матрицы для ОТ геномную РНК PPV (раздел 3.3).

### **3.13. Изучение переноса PPV тлями.**

Вид тли, колонизирующей побеги зараженных деревьев, идентифицировали с помощью определителя насекомых (Определитель..., 1964) при содействии А.К. Ахатова. Вирофорность тлей определяли методом ОТ-ПЦР, используя в качестве матрицы для ОТ тотальную РНК, выделенную из тлей с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit. С этой целью 40 мг тлей, собранных с того или иного дерева, гомогенизировали в лизирующем буфере RLT, входящем в состав набора, и выделяли тотальную РНК в соответствии с инструкцией к



набору. ОТ-ПЦР выполняли с праймерами P1/P2 (Табл. 3) как описано в разделе 3.6. Использовали два способа заражения индикаторных растений тлями. Согласно первому, около 50 бескрылых особей *B. cardui*, *P. humuli* или *Myzus cerasi* переносили непосредственно с зараженных побегов на листья индикаторных растений (*N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *P. cerasus*, *P. domestica*) в стадии 6 – 8 листьев (растения табака) или в возрасте 3 - 4 месяца (сеянцы сливы и вишни). Другая методика состояла в том, что такое же количество особей высаживали на листья индикаторных растений после двухчасового голодания насекомых в чашках Петри и их последующего питания на зараженных PPV листьях в течение 5 мин (Labonne et al., 1995; Glasa et al., 2013). Каждым изолятом вируса инокулировали 4 - 6 индикаторных растений. Инокулированные и системные листья индикаторных растений проверяли на наличие инфекции с помощью ОТ-ПЦР с праймерами P1/P2 и штаммспецифичными праймерами через 2 – 3 мес. после инокуляции травянистых растений и через 6 – 11 мес. после инокуляции растений косточковых культур.

Таблица 2. Праймеры для амплификации 3`-терминального участка генома PPV.

Штамм вируса	Участок генома <sup>1)</sup>	Название пары праймеров (+/-) <sup>2)</sup>	Последовательность праймеров, 5`-3`	Размер продукта ПЦР, тпн <sup>3)</sup>	Ссылка <sup>4)</sup>
CR	(Cter)NIb-CP-3`NCR	p84C/4CPR1	p84C: TGAAGAAGCTTCTGAGACAG 4CPR1: GAGAAAAGGATGCTAACAGGAATC	1,2	Fanigliulo et al., 2003/ Matic et al., 2011
Rec	(Cter)NIb-CP-3`NCR	mD5/4CPR1	mD5: TATGTCACATAAAGGCGTTCTC 4CPR1: GAGAAAAGGATGCTAACAGGAATC	1,2	Šubr et al., 2004/ Matic et al., 2011
D	(Cter)NIb-CP-3`NCR	NIbF/4CPR1	NIbF: CTTGAATGGGACAGATCAAATGA 4CPR1: GAGAAAAGGATGCTAACAGGAATC	1,3	Wallis et al., 2007/ Matic et al., 2011
M	(Cter)NIb-CP-3`NCR	mM5/4CPR1	mM5: GCTACAAAGAACTGCTGAGAG 4CPR1: GAGAAAAGGATGCTAACAGGAATC	1,2	Šubr et al., 2004/ Matic et al., 2011
C	(Cter)NIb-CP-3`NCR	p84C/4CPR1	p84C: TGAAGAAGCTTCTGAGACAG 4CPR1: GAGAAAAGGATGCTAACAGGAATC	1,3	Fanigliulo et al., 2003/ Matic et al., 2011
W	(Cter)NIb-CP-3`NCR	P3DW/4CPR1	P3DW: ACATAGCAGAGACAGCATTG 4CPR1: GAGAAAAGGATGCTAACAGGAATC	1,2	Сконструирован в нашей работе/ Matic et al., 2011
	(Cter)NIb-(Nter)CP	P3DW/P4b-W	P3DW: ACATAGCAGAGACAGCATTG P4b-W: AGCTTTC AACCGTGGTACTG	0,5	Оба праймера сконструированы в нашей работе
CV	(Cter)NIb-CP-3`NCR	CVseq/4CPR1	CVseq: AAGCGTACACCGATGAAGAGGCA 4CPR1: GAGAAAAGGATGCTAACAGGAATC	1,2	Сконструирован в нашей работе/ Matic et al., 2011
	(Cter)NIb/(Nter)CP	Potyviriid primer 2/tat2cpR	Potyviriid primer 2: GGBAAYAAAYAGY GGDCARCC tat2cpR: ACCAAAGTTACGTTATCATCA	1,0	Gibbs & Mackenzie, 1997/сконструирован в нашей работе
	(Cter)NIb/(Nter)CP	NIb2F/tat2cpR	NIb2F: GTITGYGTIGAYGAYTTYAAAYAA/ tat2cpR: ACCAAAGTTACGTTATCATCA	0,7	Zheng et al., 2010/сконструирован в нашей работе

1) (Cter)NIb-CP-3`NCR - участок генома, включающий C-терминальную последовательность гена NIb, полную последовательность гена белка оболочки (CP) и часть 3'-концевой нетранслируемой последовательности; (Cter)NIb-(Nter)CP - участок генома, включающий C-терминальную последовательность гена NIb и N-терминальную последовательность гена белка оболочки (CP).

2) - «+» - прямой (смысловой) праймер, «-» - обратный (антисмысловой) праймер.

3) - тпн – тысяч пар нуклеотидов.

4) - ссылка на публикацию, в которой праймер был сконструирован и использован впервые.

Таблица 3. Праймеры для диагностики вируса оспы сливы и определения штамма изолята с помощью ОТ-ПЦР.

Штамм вируса	Название пары праймеров	Размер продукта ПЦР, пн <sup>1)</sup>	Последовательности праймеров 5`-3` <sup>2)</sup>	Участок генома <sup>3)</sup>	Ссылка <sup>4)</sup>
Все известные штаммы	P1/P2	243	P1 (-) ACCGAGACCACTACACTCCC P2 (+) CAGACTACAGCCTCGCCAGA	(Cter)CP-3`-NCR	Wetzel et al., 1991
Все известные штаммы	H1/H2	220	H1 (-) GTCTCTTGCACAAGAACTATAACC H2 (+) GTAGTGGTCTCGGTATCTATCATA	(Cter)CP-3`-NCR	Levy and Hadidi, 1994
D	P1/PD	198	P1 (-) ACCGAGACCACTACACTCCC PD (+) CTTC AACGACACCCGTACGG	(Cter)CP-3`-NCR	Olmos et al., 1997
M	P1/PM	198	P1 (-) ACCGAGACCACTACACTCCC PM (+) CTTC AACACGCCTGTGCGT	(Cter)CP-3`-NCR	Olmos et al., 1997
M	mM5/mM3	459	mM5 (+) GCTACAAAGAACTGCTGAGAG mM3 (-) CATTTCCATAAACTCCAAAAGAC	(Cter)NIb-(Nter)CP	Šubr et al., 2004
Rec	mD5/mM3	605	mD5 (+) TATGTCACATAA AGGCGT TCTC mM3 (-) CATTTCCAT AA ACTCCAAAAGAC	(Cter)NIb-(Nter)CP	Šubr et al., 2004
EA	M8/M9	167	M8-5` (+) TAGTCACCACTACACAGCAG M9-3` (-) AGGAGGTGTAGTAGTTGTTG	(Nter)CP	Szemes et al., 2001
C	SoC-2/up/ SoC-2/dn	193	SoC-2/up (+) TCCACCATTCCCAAATCTG SoC-2/dn (-) TACATCTCGATCCTTCCTC	(Nter)CP	Nemchinov and Hadidi, 1998
C	HsoC-1/up/ HsoC-1/dn	259	HsoC-1/up (+) TAACAATGCTGGGGATGAGCTC HsoC-1/dn (-) ATGGACTTGTCACTACTGG	(Nter)CP	Nemchinov et al., 1998
C	M10-5`/M11-3`	224	M10-5` (+) GGGAAATGATGACGACGTA ACTCT M11-3` (-) CAATTACCCCATACGAGAAT	(Nter)CP	Szemes et al., 2001

CR	CR8597F/ CR9023R	427	CR8597F (+) ATGATGTGACGTTAGTGGAC CR9023R (-) TCGTGTGTTAGACAGGTCAAC	(Cter)NIb-(Nter)CP	Glasa et al., 2013
W	3174-SP-F3/3174-SP-R1	347	3174-SP-F3 (+) AGCCACATCGACCCAGCCCCTG 3174-SP-R1 (-) ACTTGTGCAGGATTGTAATGAGC	CP	James and Varga, 2004
W	W8328F/W8711R	384	W8328F (+) GCATCAATGGTAGAGGCATG W8711R (-) CATTGACGTTGTGCTCTGCA	(Cter)NIb-(Nter)CP	Glasa et al., 2011
CV	CV-P1F/CV-P1R1	645	CV-P1-F (+) ACTGCAAGCGCATGGAAGGGTTGGATGA CV-P1-R1 (-) TCAGAAATGTTGCGTGGATTGAGGACGA	P1	Сконструированы в нашей работе
CV	CV-NIbF/CV-CPR1	617	CV-NIb-F (+) ACGTGGATATATATGATGATCT CV-CP-R1 (-) TTGGTGGCGTATTCTGCAGGCT	(Cter)NIb-(Nter)CP	Сконструированы в нашей работе

1) пн - количество пар нуклеотидов.

2) "+" - прямой (смысловый) праймер, «-» - обратный (антисмысловый) праймер.

3) (Cter)NIb-(Nter)CP - участок генома, включающий С-терминальную последовательность гена NIb и N-терминальную последовательность гена белка оболочки (CP); CP - ген белка оболочки; (Nter)CP - N-терминальная последовательность гена белка оболочки (CP); (Cter)CP-3'-NCR - участок генома, включающий С-терминальную последовательность гена белка оболочки и часть 3'-нетранслируемой последовательности; P1 - ген P1.

4) - ссылка на публикацию, в которой праймер был сконструирован и использован впервые.

## 4. Результаты и обсуждение

### 4.1. Общая характеристика новых изолятов PPV.

При обследовании насаждений косточковых культур обнаружено 166 новых изолятов вируса (Табл.1). Они были выявлены в сортовых и ботанических коллекциях, сортоиспытательных участках, плодоносящих и заброшенных садах, дачных участках и дикорастущих деревьях на сливе, вишне обыкновенной, алыче, абрикосе, персике, нектарине, вишне войлочной, терне и сливе канадской как на интродуцированных сортах косточковых культур, так и на сортах российской селекции. Все изоляты, за исключением обнаруженных на сливе канадской (*P. nigra*), индуцировали характерные симптомы на листьях зараженных растений (Рис. 1). Инфекция на *P. nigra* была бессимптомной. В соответствии с протоколом Европейской организации по защите и карантину растений (EPPO, 2004), присутствие вируса в образцах, включенных в Табл. 1, было подтверждено двумя независимыми методами лабораторного анализа: ИФА и ОТ-ПЦР. В DAS-ELISA оптическая плотность в образцах, содержащих PPV, обычно составляла не менее 2,0 единиц при максимальном сигнале в отрицательном контроле не выше 0,2 единиц. В иммуноспецифической ОТ-ПЦР с универсальными праймерами P1/P2 в PPV-положительных образцах образовывались продукты ожидаемого размера 243 пн. Расхождений между данными ИФА и ОТ-ПЦР при диагностике PPV не обнаружено.

Определен штамм каждого изолята. Большая часть принадлежала к известным штаммам D (72 изолята), С (40), W (35), Rec (4) и M (1). В то же время, некоторые изоляты PPV, выявленные на вишне ("вишневые изоляты"), не распознавались в ОТ-ПЦР ни с одной из известных на тот момент пар штаммспецифичных праймеров. Для ряда других вишневых изолятов обнаружилось несоответствие результатов идентификации штамма с помощью ОТ-ПЦР и TAS-ELISA со штаммспецифичными антителами. При последующей работе было установлено, что такие изоляты принадлежат к двум новым штаммам вируса: CR (Cherry Russian) и CV (Cherry Volga). Всего обнаружено 9 изолятов штамма CR и 5 изолятов штамма CV. У 115 изолятов были секвенированы филогенетически информативные 3'-концевые последовательности генома различной длины, включающие, полностью или частично, С-терминальный участок гена N1b, ген БО и часть 3'-концевой нетранслируемой последовательности. У 31 изолята определена полная последовательность генома. 146 последовательностей были депонированы в GenBank. Как правило, депонировали наиболее дивергентные последовательности. Например, 3'-концевые последовательности генома изолятов Pk, Pk1, Pk2, Pk5, Pk9 (штамм W) или Kisl-1pl, Kisl-2pl, Kisl-3pl (штамм Rec) оказались идентичны, поэтому в GenBank были депонированы последовательности только одного из них, именно Pk и Kisl-1pl. Следует отметить, что в тех случаях, когда

секвенировали и частичные, и полные последовательности генома определенного изолята, эти последовательности, определенные независимо и разными методами, оказывались идентичны.

Ни в одном случае не было зафиксировано смешанной инфекции несколькими штаммами вируса. Штаммы Т, Ап, ЕА в наших исследованиях не обнаружены.

#### **4.2. Характеристика российских изолятов штаммов D, M и Res.**

В зарубежной Европе практически все изоляты PPV относятся к штаммам D, M или Res. PPV-D и PPV-M находили в России (Приходько и соавт., 2011; Чирков и Приходько, 2015; Приходько и соавт., 2019), однако их молекулярно-биологические свойства не были изучены. Изоляты штамма Res в России не были обнаружены. В этой связи нами было предпринято исследование, направленное на поиск и характеристику изолятов PPV-D, PPV-M и PPV-Res в насаждениях косточковых культур на территории Европейской России.

##### **4.2.1. Штамм D.**

Обнаружено 72 новых изолятов PPV-D на сливе, алыче, персике, нектарине, абрикосе и войлочной вишне. Они были найдены по всей Европейской России от Балтики до Северного Кавказа и Крыма (Табл. 1). Принадлежность к штамму D установлена методом ОТ-ПЦР с праймерами P1/PD (Табл. 3) и секвенированием 3'-терминального участка генома.

Последовательности (Cter)N1b-CP-3'-NCR длиной 1264 нт амплифицировали с помощью праймеров N1bF/4CPR1 (Табл. 2). Наиболее дивергентные 3'-концевые последовательности изолятов, различающихся также по виду растения-хозяина и географической локализации, были отобраны для последующего анализа и депонированы в GenBank под номерами, указанными в Табл. 1. Филогенетический анализ этих последовательностей (вместе с известными изолятами из других регионов мира) показал, что российские изоляты распределялись в несколько кластеров или клад (Рис. 4).

Самая большая группа I состояла из изолятов, обнаруженных в сортовых коллекциях НБС на местных и интродуцированных сортах персика, нектарина, сливы и абрикоса, а также изолятов AL-R, N1, Lav, AL-G, AL-2 и Val на алыче, дикорастущей внутри или в непосредственной близости от сортовых коллекций НБС. В эту же группу входят изоляты из Китая, Словакии, Турции, а также венгерские изоляты Soscut1 и Szigetcsep1. Возможно, описываемый кластер возник в результате интродукции венгерских изолятов PPV в 80-х годах прошлого века, когда происходил интенсивный обмен посадочным материалом между НБС и Венгрией. С другой стороны, изолят K22 обнаружен на сливе турецкого сорта Изюм Эрик. Солидный возраст зараженных деревьев (14 – 20 лет), большое количество тли различных видов и наличие мотива DAG в БО всех крымских изолятов могли способствовать распространению PPV в коллекционных насаждениях и окружающей дикорастущей флоре.

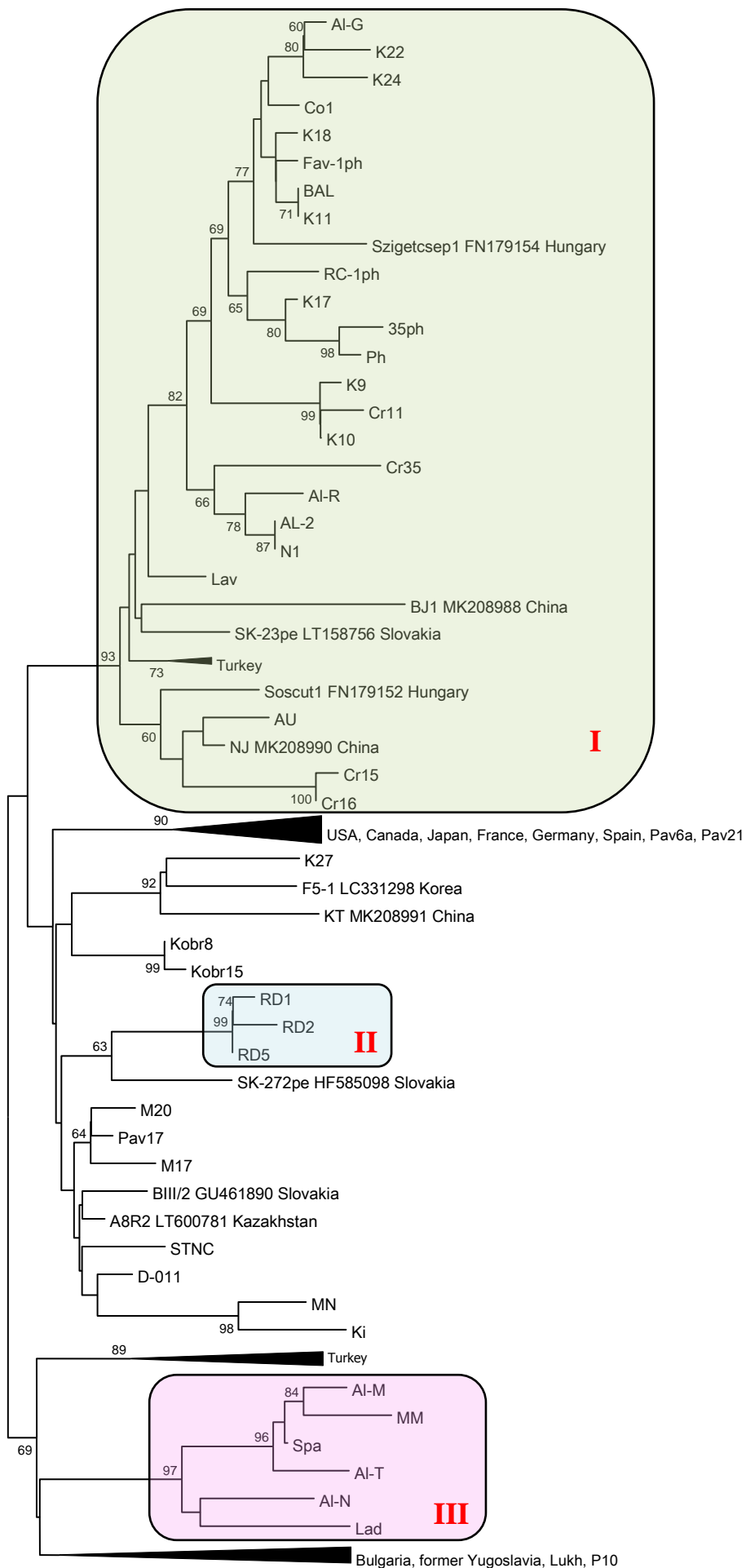
Изоляты RD1, RD2 и RD5 с войлочной вишни формировали отдельную кладу II и, возможно, являются примером кластеризации по растению-хозяину. В N-конце БО этих изолятов выявлены замены, уникальные для PPV-D из войлочной вишни. Остатки глутаминовой кислоты (E) и гистидина (H) обнаружены в позициях 73 и 90, соответственно, вместо остатков глицина (G) и аспарагина (N), занимающих эти позиции у всех других изолятов штамма D. Мутации в N-конце БО могут влиять на дальний транспорт и тем самым опосредовать круг хозяев PPV (Carbonell et al., 2013; Revers and Garcia, 2015). Возможно, мутации G73E и N90H способствуют адаптации PPV-D к войлочной вишне. Изоляты RD1, RD2 и RD5 найдены на трех разных дачных участках в Раменском районе Московской области. Хотя войлочная вишня известна как экспериментальный хозяин PPV-D (Darmsteegt et al., 1997), в природных условиях изоляты этого штамма обнаружены на этом хозяине впервые. Следует отметить, что симптомы PPV-D на войлочной вишне (Рис.1) отличаются от симптомов на других косточковых культурах.

Кластер III формировали крымские изоляты AL-N, AL-T, AL-M, MM, Spa и Lad, обнаруженные на дикорастущей алыче вне территории НБС. Они оказались наиболее родственны изолятам из Болгарии и бывшей Югославии, а также российским изолятам Lukh и P10 из Луховицкого района Московской области и г. Пятигорска, соответственно. Еще два российских изолята, Ravba и Rav21 из сортовой коллекции сливы и алычи ВИР, кластеризовались вместе с изолятами из Западной Европы, США, Канады и Японии.

Остальные изоляты были обнаружены на сливе, абрикосе и алыче в Крыму, Мичуринске, Дагестане, Ленинградской и Московской областях. Установить возможные эволюционные связи между ними и с изолятами из Кореи, Китая, Словакии и Казахстана при анализе частичных последовательностей генома не представляется возможным из-за низких значений бутстрэп-анализа. Отсутствие четкой кластеризации частичных последовательностей типично для изолятов штамма D и обусловлено высоким сходством их геномов (Schneider et al., 2011).

Рис. 4. Филогенетический анализ 3'-концевых последовательностей (Cter)NIb-CP-3'-NCR изолятов PPV-D. Дерево реконструировано методом максимального правдоподобия с помощью программы MEGA7. Названия, номера в GenBank и географическая локализация изолятов не российского происхождения указаны на концах ветвей. Для российских изолятов на концах ветвей указаны только названия; их номера в GenBank указаны в табл. 1. Кластеры I, II и III выделены заливкой. Значения бутстрэп-анализа из 1000 случайных выборок (>60%) указаны рядом с узлами. Масштабная черта означает количество замен на 1 нуклеотид.

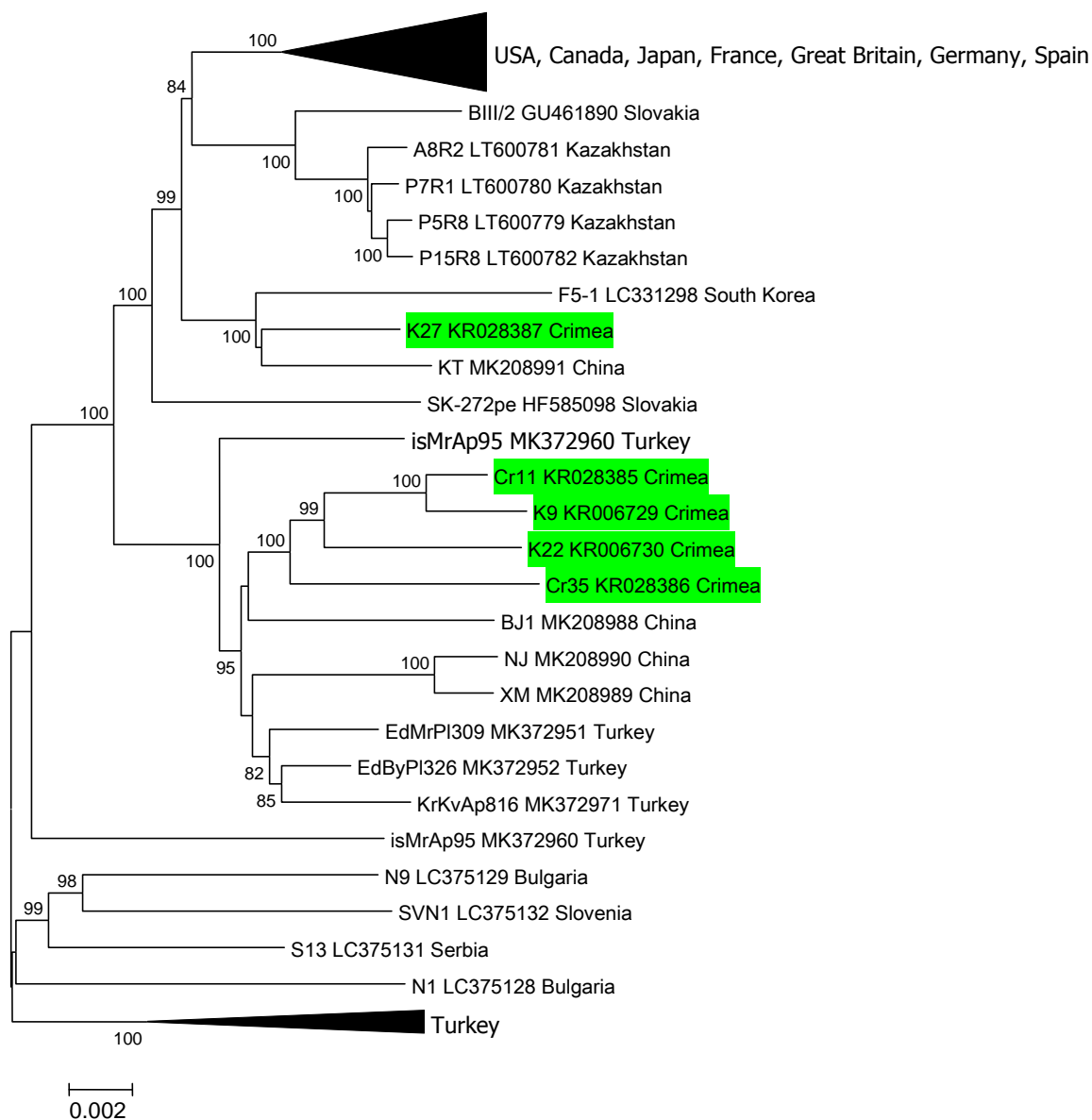




Секвенированы 5 полногеномных последовательностей крымских изолятов PPV-D (Cr35, Cr11, K9, K22, K27). В этой работе впервые в качестве матрицы для синтеза библиотек кДНК использована геномная РНК из вирусных частиц, полученных путем иммуносорбции на поликлональных антителах к вирусу. Для каждого из 5 изолятов собирался один контиг, покрывающий свыше 99% генома референсного изолята (Fantasia, AY912056) со средним покрытием 234х. Длина геномов четырех изолятов составила 9786 нт, что типично для изолятов этого штамма. Геном Cr11 оказался короче на 3 нт из-за делеций в гене N1b. Делеции нуклеотидов А и Т в триplete GAT (позиции 8548 – 8549) и первого нуклеотида G в следующем триplete GGC (позиция 8550) не приводили к сдвигу рамки считывания, но сопровождалась потерей остатка аспарагиновой кислоты (D) в С-конце репликазы. Такого рода делеция в геномах PPV обнаружена впервые. По-видимому, она не влияет на активность репликазы, поскольку содержание вируса в растении нектарина, зараженным этим изолятом, оставалось стабильно высоким в течение трех лет подряд. Геномы крымских изолятов отличались от остальных PPV-D на 2,3 - 3%, что выше среднего уровня изменчивости изолятов штамма D: 1,7% для всего пула полногеномных последовательностей или 2% за вычетом исключительно консервативных последовательностей изолятов PPV-D из США, Канады и Японии (James et al., 2013; Garcia et al., 2014; Gurcan et al., 2020).

Филогенетический анализ полногеномных последовательностей показал, что крымские изоляты Cr35, Cr11, K9 и K22 образуют отдельную монофилетическую кладу со 100% бутстрэп-поддержкой, входящую в кластер изолятов из Турции и Китая (Рис. 5). Географическую кластеризацию, характерную для изолятов PPV-D из США, Канады и Японии, объясняют интродукцией одного - двух изолятов из Европы (Schneider et al., 2011; Maejima et al., 2011; Hajizadeh et al., 2019). Крымский кластер мог образоваться аналогичным образом, т.е. в результате интродукции изолята-основателя, его распространения тлями и последующей диверсификации. Нельзя исключить, что предками большинства изолятов из НБС являлись венгерские или турецкие изоляты. Последовательность изолята K27 из алычи кластеризовалась отдельно от других крымских изолятов. Возможно, он проник в НБС в результате еще одной интродукции.

Рис. 5. Филогенетический анализ полногеномных последовательностей изолятов PPV-D. Дерево реконструировано методом присоединения соседей. Названия изолятов, их номера в GenBank и географическая локализация указаны на концах ветвей. Российские (крымские) изоляты выделены зеленой заливкой. Значения бутстрэп-анализа из 1000 случайных выборок (>80%) указаны рядом с соответствующими узлами. Масштабная черта означает количество замен на 1 нуклеотид.



Предполагаемый PPV-D-специфичный эпитоп, распознаваемый антителами 4DG5, картирован в N-конце БО внутри последовательности <sup>49</sup>FTPATTTQPATKPV<sup>62</sup> (Candresse et al., 2011). У ряда новых изолятов в этой последовательности обнаружены замены (Табл. 4). Методом TAS-ELISA было изучено их возможное влияние на связывание антител 4DG5.

Очевидно, что замены пролина (P) на серин (S) в позиции 51, треонина (T) на изолейцин (I) в позиции 53, S на P в позиции 62 не влияют на связывание антител 4DG5. В то же время, мутации T58P и K59R препятствуют распознаванию соответствующих изолятов этими антителами. Изолят Vulkan (AY912057) с мутацией T58P не распознается антителами 4DG5 (D. James, личное сообщение). Мутация K59R препятствовала распознаванию изолята BOS49PI (AJ749999, PPV-D) антителами 4DG5 (Matic et al., 2006). Кроме того, при анализе аминокислотных последовательностей, депонированных в GenBank, мутация K59R обнаружена в большинстве изолятов группы Penn из США (AF401295, AF401296, EF611241, EF640933, EF640935 - EF640939, EU818840), изоляте Chile 112 (AF440741) из Чили, а также

в изолятах SK-272 (HF585098) и 02 (KF840173) из Словакии. Данные по взаимодействию этих изолятов с антителами 4DG5 в литературе отсутствуют. Мутация Q55R полностью ингибирует связывание 4DG5 с гомологичным эпитопом (Candresse et al., 2011). Таким образом, полученные результаты позволяют уточнить структуру PPV-D-специфичного эпитопа, который с большой вероятностью представлен последовательностью <sup>55</sup>QRATKP<sup>60</sup>.

Таблица 4. Влияние аминокислотных замен в PPV-D-специфичном эпитопе на его распознавание моноклональными антителами 4DG5.

Изолят	Последовательность, включающая PPV-D-специфичный эпитоп <sup>1)</sup>	Оптическая плотность <sup>2)</sup>	
		Антитела 4DG5 <sup>3)</sup>	Поликлональные антитела <sup>4)</sup>
RD1	FTPATTTQATKPV <sup>5)</sup>	2.65	2.40
RD2	FTPAITQATKPV	2.47	2.41
K11	FTPATTTQATKPVV	2.66	2.56
K22	FTPATTTQATKPVV	2.87	2.81
P10	FTPATTTQATRPVS	0.56	2.73
Cr35	FTSATTTQATKPV	2.49	2.63
K27	FTPATTTQAPV <sup>6)</sup> KPV	0.11	2.69

- Аминокислотные остатки от 49 до 62 (нумерация по белку оболочки изолята RD1).
- При длине волны 405 нм (среднее из 2 повторностей).
- TAS ELISA с помощью K-12B kit (Agritest, Италия).
- DAS ELISA с помощью набора Reagent set SRA 31505 (Agdia, США).
- Последовательность, характерная для большинства изолятов PPV-D. Аминокислотные замены выделены зеленой заливкой.

#### 4.2.2. Штамм М.

В сортовой коллекции абрикоса НБС на сорте украинского происхождения Херсонский 23 с типичными симптомами шарки на листьях и косточках плодов (Рис. 1) обнаружен изолят Н23. В ОТ-ПЦР с праймерами P1/PM и mM5/mM3 образовывались продукты ожидаемого размера 198 и 459 пн, соответственно, что указывало на его принадлежность к штамму М. Кроме того, Н23 распознавался в TAS-ELISA моноклональными антителами AL. Участок генома (Ster)N<sub>Ib</sub>-CP-3'-NCR длиной 1220 нт был амплифицирован с помощью праймеров mM5/4CPR1 (Табл. 2) и секвенирован. Филогенетический анализ гена БО показал, что изолят Н23 кластеризуется с западноевропейскими изолятами этого штамма (Рис. 5). Это подтвердил и анализ нуклеотидных позиций в гене БО, дискриминирующих две группы PPV-М: в геноме Н23 позиции 8606, 8775, 8951, 9032, 9068, 9108 и 9347 заняты нуклеотидами, характерными для группы Ма. Это первое обнаружение PPV-М в Крыму. В остальных деревьях сорта Херсонский 23, растущих на том же участке, PPV не обнаружен. По всей вероятности, изолят Н23 перенесен на зараженное растение абрикоса тлями с неизвестного пока источника.

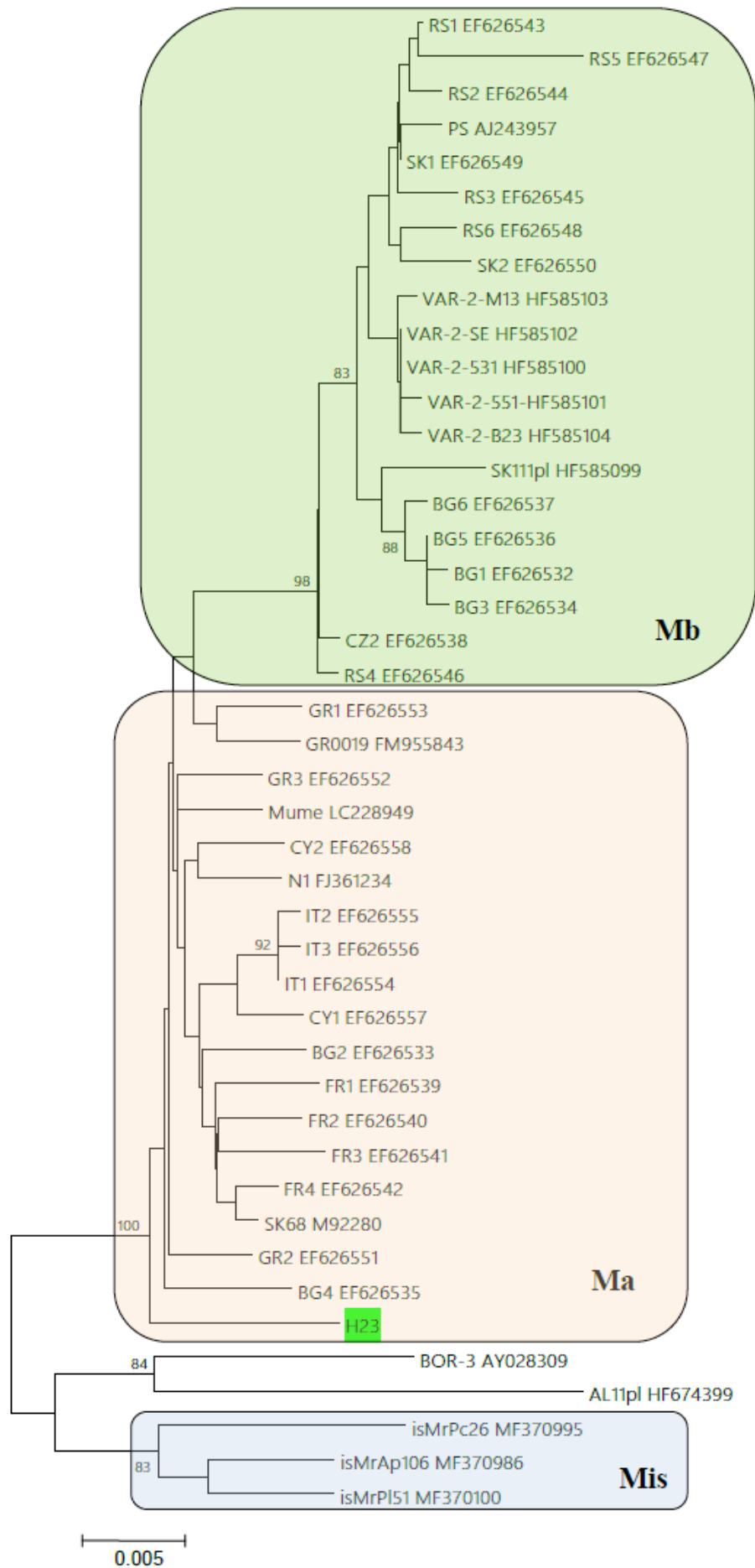


Рис. 6. Филогенетический анализ гена белка оболочки изолятов PPV-M. Дерево реконструировано методом присоединения соседей с помощью программы MEGA7. Названия изолятов и их номера в GenBank указаны на концах ветвей. Значения бутстрэп-анализа из 1000 случайных выборок (>80%) указаны рядом с узлами. Изолят H23 выделен зеленой заливкой. Цветной заливкой объединены изоляты, относящиеся к группам Ma, Mb и Mis. В группы Ma и Mb включены последовательности гена белка оболочки PPV-M, доступные в GenBank. В группу Mis включены репрезентативные турецкие изоляты, обнаруженные на персике (MF370995), абрикосе (MF370986) и сливе (MF370100). Масштабная черта означает количество замен на 1 нуклеотид.

Анализ всех доступных полногеномных последовательностей изолятов штамма M выявил два РС в словацком изоляте VAR-2/551 (Рис. 7). Оба были предсказаны шестью алгоритмами, встроенными в RDP4, со статистически значимыми *P*-values. Основным родителем является изолят SK-111pl из Словакии, а минорным родителем - венгерский изолят SK68. Рекомбинация между изолятами разных штаммов PPV была показана ранее (Glasa et al., 2004; Serce et al., 2009; Glasa et al., 2011). Внутриштаммовая рекомбинация обнаружена нами впервые.

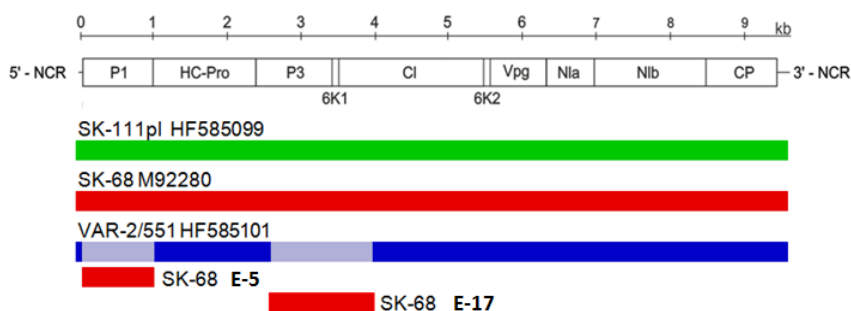


Рис. 7. Схематическое изображение рекомбинационных событий, обнаруженных при анализе выравнивания всех доступных полногеномных последовательностей изолятов PPV-M с помощью RDP4 v.69. Показаны только рекомбинант и оба родителя; остальные изоляты на схеме не показаны. Названия изолятов и их номера в GenBank приведены поверх длинных прямоугольников. Короткие прямоугольники под ними указывают положение рекомбинантной последовательности в рекомбинантном геноме, название предполагаемого минорного родителя и среднее значение *P*-value. Вверху схемы представлены карта генома PPV и масштабная линейка.

#### 4.2.3. Штамм Rec.

Хотя штамм Rec - один из самых распространенных в Центральной и Восточной Европе, в России изоляты этого штамма не были известны. В нашей работе впервые в России обнаружены 4 изолята PPV-Rec. Kisl-1pl, Kisl-2pl и Kisl-3pl найдены на сливе трех разных сортов на дачных участках в г. Кисловодске Ставропольского края, а изолят K28 на

дикорастущей алыче в Крыму. Их принадлежность к PPV-Rec была установлена с помощью ОТ-ПЦР, а также секвенированием 3'-концевой последовательности генома. В ОТ-ПЦР с праймерами P1/PM и mD5/mM3 (Табл. 3) образовывались продукты ожидаемого размера 198 и 605 пн, соответственно, что указывало на принадлежность выявленных изолятов к штамму Rec (Рис. 8). Определены 3'-концевые последовательности четырех российских PPV-Rec. Участки генома (Ster)NIb-CP-3'-NCR длиной 1353 нт оказались идентичны между собой, а также европейским изолятам PPV-Rec на 98,9 – 99,1%. 3'-концевые последовательности генома трех кисловодских изолятов оказались полностью идентичны.

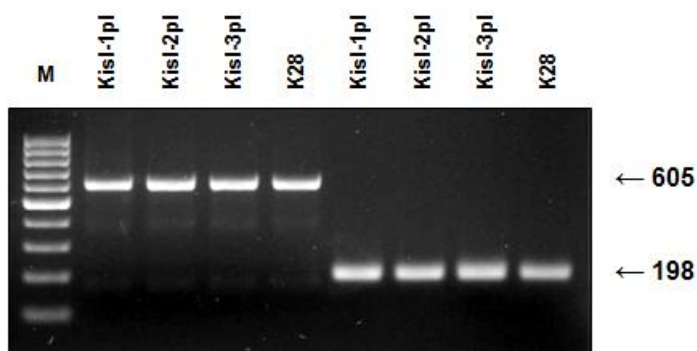


Рис. 8. Анализ продуктов, полученных при иммуноспецифической ОТ-ПЦР образцов листьев сливы и алычи, с помощью электрофореза в 2% геле агарозы. М - GeneRuler 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific). Стрелки указывают на продукты ПЦР, специфичные для PPV-Rec (605 пн) и PPV-M (198 пн).

Определены полногеномные последовательности изолятов K28 и Kisl-1pl с помощью HTS на платформе 454. При сборке прочтений, полученных при секвенировании Kisl-1pl, получен 1 контиг длиной 9742 нт со средней глубиной покрытия референсного изолята (BOR-3, AY028309) 90х. При сборке прочтений, полученных при секвенировании K28, получено 14 контигов длиной 119 – 2190 нт со средней глубиной покрытия референсного изолята (BOR-3, AY028309) 15х. 44 (Kisl-1pl) и 167 (K28) нт на 5'- конце генома были секвенированы с помощью 5'-RACE. Оба генома состояли из 9786 нт, исключая поли-А-последовательность на 3'-конце. Идентичность между полными геномами K28, Kisl-1pl и всех других изолятов PPV-Rec составила 98,1 – 99%; полипротеины оказались идентичны на 98,9 – 99,4%, что подтверждает низкую внутриштамовую вариабельность PPV-Rec (Glasa et al., 2004; Glasa et al., 2005). Филогенетический анализ полногеномных последовательностей показал, что все известные изоляты PPV-Rec группируются в 3 клады (Рис. 9А). K28 кластеризовался с изолятами из Словакии и Болгарии, а Kisl-1pl – с изолятом Valjevka из бывшей Югославии, что может указывать на интродукцию предков K28 и Kisl-1pl из Восточной Европы.

При анализе выравнивания полногеномных последовательностей изолятов штаммов D, M и Rec (секвенированных в нашей работе и доступных в GenBank) с помощью программы RDP4 во всех PPV-Rec выявлены 2 PC (Рис. 10). PC1 в 3'-конце генома было предсказано ранее (Glasa et al., 2004). Оно является характерной особенностью штамма Rec и обнаружено также в изолятах K28 и Kisl-1pl. PC2 в 5'-конце всех доступных полногеномных последовательностей предсказано нами впервые. Рекомбинантная последовательность охватывает С-терминальную часть гена P1 и примерно 2/3 гена HCPro. PC2 было поддержано с высокой достоверностью всеми методами, встроенными в RDP4 (Табл. 5). Хотя границы PC2 у разных изолятов варьируют, последовательность от 940 до 1838 нуклеотида является общей для всех изолятов. Сопоставление филогенетических деревьев, реконструированных на основе полногеномных последовательностей (Рис. 9А) и предполагаемого рекомбинантного участка генома (Рис. 9Б) выявило существенные различия в их топологии. Кластер изолятов штамма Rec на рис. 9Б располагается ближе к PPV-M, чем к PPV-D, в то время как на Рис. 9А наблюдается обратная картина. Неконгруэнтность филогенетических деревьев может указывать на рекомбинацию в исследуемом регионе генома (Chare and Holmes, 2006).

Таким образом, оба рекомбинантных участка генома, обнаруженные в PPV-Rec, по-видимому, происходят от PPV-M. Однако вероятности PC1 и PC2 различаются на много порядков (Табл. 5). Кроме того, положение брейкпойнта, ограничивающего PC1, неизменно для разных изолятов (нт 8443 – 8450 в зависимости от программы для анализа рекомбинации). Напротив, границы PC2 заметно варьируют у разных изолятов.

Возможны два объяснения этих различий между PC1 и PC2. Первое основано на том, что вероятность обнаружения рекомбинации зависит от уровня дивергенции родительских последовательностей (Salminen, 2009). Дивергенция между PPV-D и PPV-M в 3'-конце генома (нт 8450 - 9786) составляет в среднем 14%. 5' - проксимальная область, в которой обнаружено PC2, содержит предковую последовательность (нт 1 - 2813), общую для штаммов D, M и Rec. Дивергенция между штаммами в этом участке генома составляет 3 - 4% (Glasa et al., 2004; Garcia et al., 2014). Небольшое генетическое расстояние между предполагаемыми родителями может быть причиной гораздо более высоких значений *P*-values, рассчитанных для PC2. Кроме того, низкий уровень полиморфизма на участке от 1 до 2813 нуклеотида (из-за высокого сходства между штаммами D, M и Rec в этом регионе) может влиять на точность определения позиций брейкпойнтов у PC2.

Другим объяснением может быть то, что PC2 произошло задолго до PC1. PPV-D и PPV-M возникли, вероятно, раньше других штаммов вируса (Sanderson et al., 2017; Hajizadeh et al., 2019). Рекомбинация между ними могла происходить неоднократно. Смешанные инфекции



PPV-D и PPV-M наблюдали на различных косточковых культурах на Балканах, где предположительно и возник PPV-Res (Kamenova, 2008; Kamenova et al., 2017; Mikec et al., 2008; Zagrai et al., 2008). Очевидно, что чем древнее РС, тем в большей степени исходные позиции брейкпойнтов могут быть маскированы последующими мутациями.

Открытие РС2 предполагает более сложную, чем считалось, эволюционную историю штамма Res. Возможно, РС2 привело к образованию промежуточного варианта PPV-D, содержащего PPV-M-производный фрагмент внутри общей предковой последовательности в 5'- проксимальном участке генома. Еще одна рекомбинация PPV-D с PPV-M в 3'- терминальной области генома (РС1) привела к возникновению эволюционно успешного штамма Res с последующим его широким распространением в Европе. Предполагаемый промежуточный вариант PPV-D мог быть потерян или пока не обнаружен.

Таблица 5. Результаты анализа рекомбинации в 10 полногеномных последовательностях изолятов штамма Res с помощью RDP v.4.35.

Рекомбинант	Номер РС <sup>1)</sup>	Позиции брейкпойнтов, нт		Основной родитель (PPV-D)	Минорный родитель (PPV-M)	P-values <sup>2)</sup>
		Начало РС <sup>1)</sup>	Конец РС <sup>1)</sup>			
BOR-3	1	8443	3' end	Ou1	GR0019	1.02 x 10 <sup>-56</sup>
	2	859	1924	Dideron	SK68	3.84 x 10 <sup>-07</sup>
BULG	1	8443	3' end	Ou1	GR0019	2.70 x 10 <sup>-60</sup>
	2	760	1838	Dideron	SK68	4.96 x 10 <sup>-07</sup>
J4c	1	8443	3' end	Ou1	GR0019	2.47 x 10 <sup>-59</sup>
	2	940	1924	Dideron	SK68	1.17 x 10 <sup>-08</sup>
K28	1	8443	3' end	Ou1	GR0019	1.28 x 10 <sup>-57</sup>
	2	869	1872	Dideron	SK68	4.80 x 10 <sup>-08</sup>
o6	1	8443	3' end	Ou1	GR0019	3.54 x 10 <sup>-54</sup>
	2	894	1964	Dideron	SK68	4.91 x 10 <sup>-09</sup>
Valjevka	1	8443	3' end	Ou1	GR0019	4.37 x 10 <sup>-56</sup>
	2	859	2804	Dideron	SK68	6.28 x 10 <sup>-13</sup>
Cdn08	1	8443	3' end	Ou1	GR0019	3.75 x 10 <sup>-63</sup>
	2	859	1924	Dideron	SK68	2.04 x 10 <sup>-11</sup>
Cdn10	1	8443	3' end	Ou1	GR0019	1.32 x 10 <sup>-61</sup>
	2	859	1924	Dideron	SK68	5.53 x 10 <sup>-09</sup>
Kisl-1pl	1	8443	3' end	Ou1	GR0019	2.17 x 10 <sup>-56</sup>
	2	760	1924	Dideron	SK68	3.38 x 10 <sup>-10</sup>
SK-514	1	8443	3' end	Ou1	GR0019	3.34 x 10 <sup>-55</sup>
	2	859	1924	Dideron	SK68	1.15 x 10 <sup>-07</sup>

1) РС – рекомбинационное событие. 2) Среднее значение (multiple comparison corrected) из 7 методов, встроенных в RDP4.

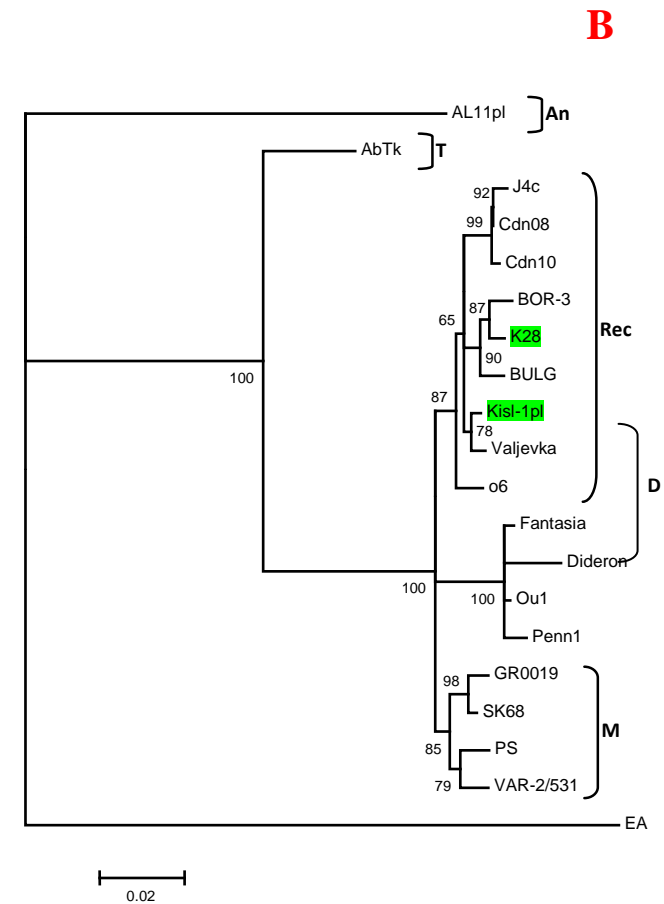
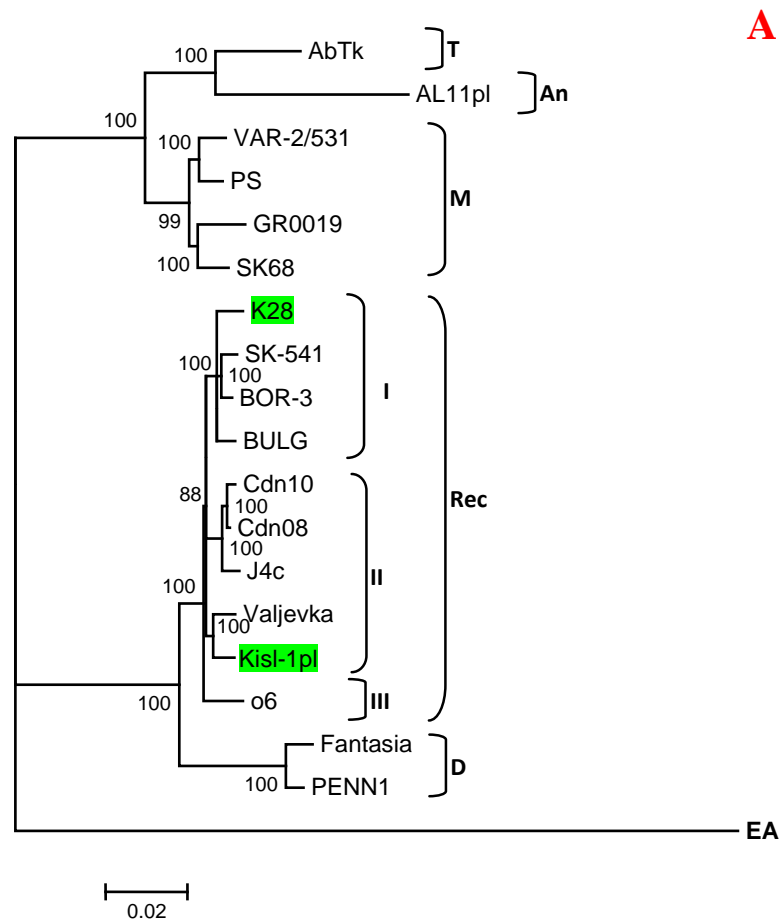


Рис. 9. Филогенетический анализ полногеномных (А) и предполагаемых рекомбинантных последовательностей в 5'-проксимальном участке генома (Б) PPV-Rec вместе с репрезентативными изолятами штаммов D, M, T и An. Деревья реконструированы методом присоединения соседей с помощью программы MEGA7. Штамм EA (AM157175) использовали в качестве филогенетической аутгруппы. Названия изолятов указаны на концах ветвей. Фигурными скобками объединены изоляты, принадлежащие к одному штамму или кладе. Изоляты K28 и Kisl-1pl выделены зеленой заливкой. Значения бутстрэп-анализа из 1000 случайных выборок (>80%, А, или >60%, Б) указаны рядом с соответствующим узлом. Масштабная черта показывает количество замен на 1 нуклеотид.

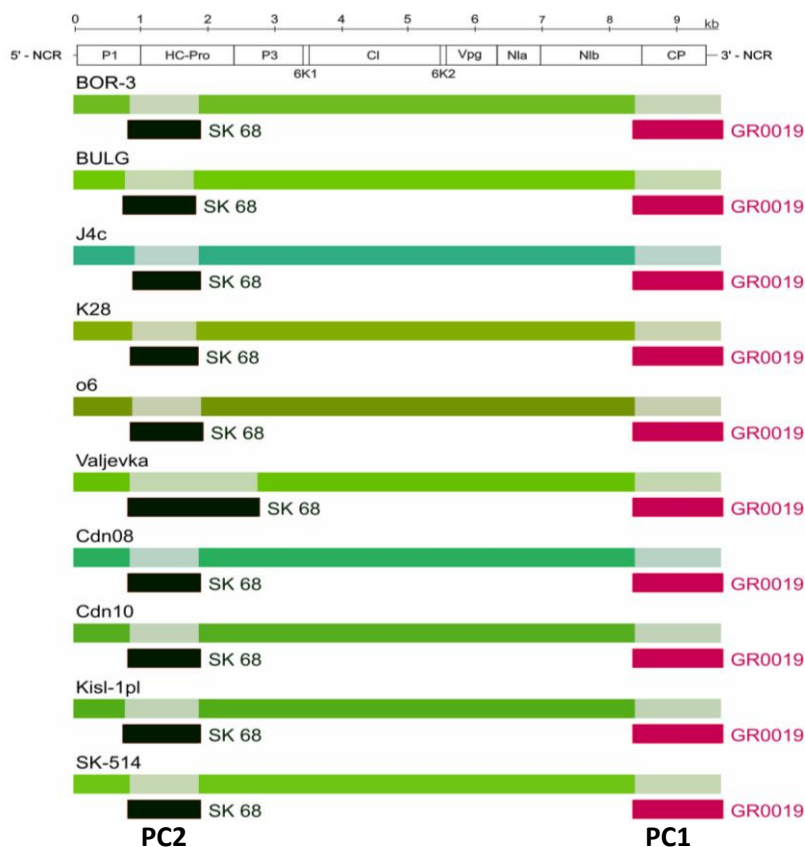


Рис. 10. Схематическое изображение рекомбинационных событий (PC1, PC2), обнаруженных при анализе выравнивания 10 доступных полногеномных последовательностей изолятов PPV-Rec с помощью RDP4 v.69. Для минимального выравнивания использовали полногеномные последовательности изолятов PPV-Rec (BOR-3, J4c, BULG, o6, Cdn08, Cdn10, Valjevka, SK-514, K28, Kisl-1pl), PPV-M (SK68, GR0019) и PPV-D (Dideron, Ou1). PPV-M и PPV-D на схеме не показаны. Названия изолятов приведены поверх длинных прямоугольников. Короткие прямоугольники под ними указывают положение рекомбинантной последовательности в рекомбинантном геноме и название предполагаемого минорного родителя. Вверху схемы представлены карта генома PPV и масштабная линейка.

Все 4 изолята PPV-Rec распознавались в TAS-ELISA с антителами AL, специфичными к штамму М. Этот результат был ожидаем, поскольку 3'-концевая последовательность PPV-Rec и, в частности, его БО происходит от штамма М (Glasa et al., 2004). Предполагаемый PPV-М-специфичный эпитоп картирован внутри последовательности от 67 до 81 аминокислотного остатка N-конца БО (Candresse et al., 2011). У изолятов K28 и Kisl-1pl обнаружены замены в этой последовательности (Табл. 6). Методом TAS-ELISA было изучено их возможное влияние на связывание антител AL.

Остатки пролина (P) и валина (V) в позициях 69 и 74, оба необходимые для связывания антител AL, присутствовали в БО K28 и Kisl-1pl, что объясняет их распознавание антителами AL. Замена R на Q (позиция 70), видимо, несущественна для связывания антител AL. В то же время, остатки лизина (K), типичного для PPV-M в позиции 68, заменены на остатки треонина (T) или изолейцина (I) у Kisl-1pl и K28, соответственно. Несмотря на то, что остатки K, T и I совершенно различны, эти замены не сказывались на связывании антител AL с соответствующим эпитопом. По-видимому, позиция 68 находится за пределами PPV-M-специфичного эпитопа.

Таблица 6. Влияние аминокислотных замен в предполагаемом PPV-M-специфичном эпитопе на его распознавание моноклональными антителами AL.

Изолят	Штамм	Последовательность эпитопа	Оптическая плотность <sup>2)</sup>	
			Поликлональные антитела <sup>3)</sup>	Моноклональные антитела AL <sup>4)</sup>
H23	M	AKPRSFSGVYGNEDAS <sup>1)</sup>	2.07	1.71
K28	Rec	ATPQSFSGVYGNEDAS	2.13	1.99
Kisl-1pl	Rec	ATPQSFSGVYGNEDAS	2.96	2.43

1) Типичная для изолятов PPV-M последовательность от 67 до 81 аминокислотного остатка (нумерация по белку оболочки изолята H23 (MN734795)).

2) Средняя (из двух повторов) при длине волны 405 нм.

3) DAS-ELISA, Reagent set SRA 31505 (Agdia, США).

4) TAS-ELISA, K-11B kit (Agritest s.r.l., Италия).

В целом, результаты изучения российских изолятов штаммов D, M и Rec показали, что, по-видимому, их предшественники были интродуцированы в Россию с зараженным посадочным материалом косточковых культур. Это указывает на важность учета фитосанитарных рисков при ввозе саженцев косточковых культур и перемещении такой продукции по территории Российской Федерации.

#### 4.3. Штамм W.

Обнаружено и охарактеризовано 35 новых изолятов PPV-W (Табл. 1). Их принадлежность к штамму W установлена методом ОТ-ПЦР с праймерами 3174SP-F3/R1 и W8328F/W8711R (Табл. 3), а также секвенированием 3'-терминальных участков генома: (Cter)NIb-(Nter)CP, гена БО или (Cter)NIb-CP-3'-NCR. Изоляты были обнаружены на сливе, терне и войлочной вишне в Москве, Московской, Тверской, Белгородской, Владимирской областях и Ставропольском крае на дачных участках, дикорастущих деревьях и в плодоносящих садах. В зеленых насаждениях г. Москвы, в Тверской и Владимирской областях PPV-W обнаружен впервые. Следует отметить, что симптомы PPV-W на войлочной

вишне оказались неотличимы от вызываемых изолятами штамма D (Рис. 1), но отличаются от симптомов на других косточковых культурах. Ряд изолятов найден в ботанической коллекции косточковых ГБС на новом природном хозяине - сливе канадской (*P. nigra*).

Секвенировано 29 3'-концевых последовательностей генома изолятов этого штамма. Их анализ показал, что ген БО состоит из 990 или 993 нт и кодирует белок размером, соответственно, 330 или 331 аминокислотных остатков. Различия в длине определяются наличием/отсутствием триплетов АТА, ГТА или GTG в 5'-проксимальном участке гена БО, что приводит к делеции остатков валина (V) или изолейцина (I) в позиции 10 N-конца БО (Рис. 11). В сайте протеолиза между N1b и БО у изолята 1410-1 в позиции +1 идентифицирован остаток валина (V). У представителей рода *Potyvirus V* в этой позиции обнаружен впервые. Другой особенностью сайта протеолиза между N1b и БО является присутствие остатков метионина (M) в позиции -3 у большинства изолятов. У других штаммов вируса (и ряда изолятов PPV-W) эту позицию занимает V или, реже, I. Единственным известным на сегодняшний день исключением является изолят Cr35 (PPV-D), у которого в позиции -3 также обнаружен остаток метионина. В N-конце БО у всех исследованных изолятов обнаружен мотив DAG, опосредующий передачу вируса тлями.

Филогенетический анализ всех доступных последовательностей гена БО PPV-W показал, что они достоверно группируются в 7 клад (Рис. 12), указывая на высокую генетическую изменчивость этого штамма. Действительно, последовательности БО PPV-W оказались идентичны на 93 - 99% на нуклеотидном и 94 - 99% на аминокислотном уровнях, что заметно выше изменчивости у других штаммов вируса. Последовательности гена БО длиной 990 нт, за исключением изолята ВУ, формируют отдельный кластер. Возможно, входящие в эту группу изоляты представляют собой отдельную эволюционную ветвь PPV-W. Кластеризации по географическому принципу не выявлено. Так, изолят Кагм из Московской области кластеризуется с ВУ из Белгородской области и с LV-141pl из Латвии. Аналогичным образом, изолят Vlad4 из Владимирской области группируется с P1 и P3 из Ставропольского края и с изолятами LV-145bt из Латвии и UKR44189 из Украины. С другой стороны, в разных кладах оказались изоляты 1410, PD2 и 1410-1, 1410-7, обнаруженные на соседних деревьях терна и сливы канадской в ботанической коллекции ГБС.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100		
W3174	NIVMHQ/A	DEEDDDPTIV	DAG	RPALLATTPP	STATAPOVTAT	STQPLQSTTS	MFNPV	FTPATQ	PSVKP	TTSATINPTS	FGVVGNESV	APSSSNALTNLER	DRDVDAG
STNB1	...V..	/N....S.VI	.....P	...LP.T	...A.....	.....I	...R.....	T.....I	.....E	...T.A.R	.....	.....	.....
RD4	...V..	/N....S.VI	...K...P	...LP.T	...A.....	.....R	...T.....	I..G	.....A.G	.....	.....	.....	.....
STNB2	...V..	/N....S.VI	.....P	...LP.T	...A.....	.....R	...T.....	I.....E	...T.A.R	.....	.....	.....	.....
PD2	.....	/N....S.	I.....Q	.....A	.....G	.....I	.....T	.....G	.....	.....	.....	.....	.....
P2-1	...V..	/N....S.VI	.....P	...ST	...A.....	D.I.....	R.A.S.T	.....I	.....A.G	.....	.....	.....	.....
P2-2	...V..	/N....S.VI	.....P	...ST	...A.....	D.I.....	R.A.S.T	.....I	.....A.G	.....	.....	.....	.....
P3	.....	/N....S.	I.....P	...T	.....A	.....I	...T.S	...T	.....A.G	.....	.....	.....	.....
1410-7	.....	/N....S.V	.....T	...S.A	.....T	.....I	.....T	.....I	.....A.G	.....	.....	.....	.....
1410-1	.....	/vN....S.V	.....T	...S.A	.....T	.....I	.....T	.....I	.....A.G	.....	.....	.....	.....
Pk	...V..	/N...E.S.VI	.....P	...LP.T	...A.....	I.....R	...T.....	I.....T.A.G	.....	.....	.....	.....	.....
BY	.....	/N....S.	I.....P	...T	...A.....	I.....L.A	...T.I	.....T.A.G	.....	.....	.....	.....	.....
1410-12	.....	/N....S.	I.....Q	.....A	.....G	.....I	...S.T	.....G	.....	.....	.....	.....	.....
PD1	.....	/N....S.	I.....Q	.....A	.....G	.....I	...N	.....G	.....	.....	.....	.....	.....
PD3	.....	/N....S.	I.....Q	.....A	.....G	.....I	...T	.....G	.....	.....	.....	.....	.....
PD4	.....	/N....S.	I.....Q	.....A	.....G	.....I	...T	.....G	.....	.....	.....	.....	.....
PD5	.....	/N....S.	I.....Q	.....A	.....G	.....I	...T	.....G	.....	.....	.....	.....	.....
1410	.....	/N....S.	I.....Q	.....A	.....G	.....I	...T	.....G	.....	.....	.....	.....	.....
LV-140p1	.....	/N....S.V	.....P	...T.L.A	.....L.A	...T.I	.....A.G	.....	.....	.....	.....	.....	.....
LV-141p1	.....	/N....S.V	.....P	...T.L.A	.....L.A	...T.I	.....A.G	.....	.....	.....	.....	.....	.....
LV-143p1	.....	/N....S.V	.....P	...T.L.A.V	.....L.A	...T.I	.....A.G	.....	.....	.....	.....	.....	.....
LV-145bt	.....	/N....S.	I.....P	...T.T	.....S	.....I.S	...T.....I	...T.A.G	.....	.....	.....	.....	.....
UKR44189	.....	/N....S.	I.....P	...T.T	.....S	.....I.S	...T.....I	...T.A.G	.....	.....	.....	.....	.....
Avang	.....	/N....S.	I.....P	...A	.....T	.....A.G	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Kp2U	...V..	/N....S.VI	.....P	...LP.T	...A.....	.....R	...T...S.I	.....A.G	.....	.....	.....	.....	.....
Karm	.....	/N....S.V	.....P	...T.L.T	.....L.A	...T.I	.....A.G	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Vlad4	.....	/N....S.	I.....P	...T	...A.....	I.S	...T.....I	...A.G	.....	.....	.....	.....	.....
Pulk	.....	/N....S.	I.....P	...A	.....T	.....A.G	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Pulk1	.....	/N....S.	I.....P	...A	.....T	.....T.A.G	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
P1	.....	/N....S.	I.....P	...T	...A.....	I.....T.S	...T	.....A.G	.....	.....	.....	.....	.....

Рис. 11. Выравнивание последовательностей N-конца БО PPV-W. В левой колонке приведены названия изолятов. Цифры над элайментом означают порядковый номер аминокислотного остатка. Косая черта указывает положение сайта протеолиза между N1b и БО. Дефис, выделенный желтым цветом, указывает положение делеции. Синим цветом выделены эпитопы, распознаваемые PPV-W-специфичными моноклональными антителами 10G7 (DEEDD), 4A11 (MFNPV), 5C1 (PSVKP) и PPV-специфичными антителами 5B (DRDVDAG). Зеленым цветом выделена последовательность DAG, обеспечивающая перенос вирус тлями.

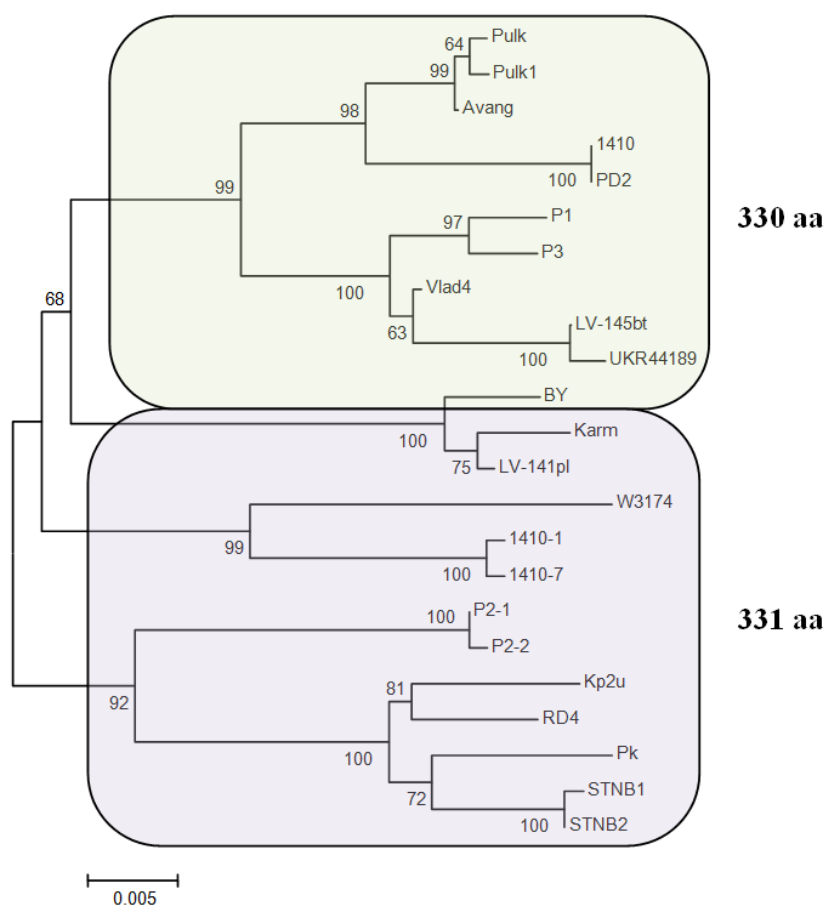


Рис. 12. Филогенетический анализ гена БО PPV-W. Дерево реконструировано методом присоединения соседей. Названия изолятов указаны на концах ветвей. Номера последовательностей в GenBank приведены в Табл. 1. Номера охарактеризованных ранее изолятов: LV-145bt - HQ670748, UKR44189 - JN596110, LV-141pl - HQ670746, W3174 - AY912055. Результаты бутстрэп-анализа из 1000 случайных выборок (в процентах) указаны рядом с узлами. Масштабная черта показывает число замен на 1 нуклеотид. Заливкой выделены группы изолятов с белком оболочки длиной 330 и 331 аминокислотных остатков.

Секвенировано 10 полных геномов новых изолятов PPV-W. Геномы RD4, STNB1, STNB2, PD2, P2-1, P3, 1410-7, 1410-1 (HG916856 – HG916863), а также P2-2 (LN852400) были определены путем секвенирования клонированных продуктов ПЦР. Последовательность генома изолята Pk (KC347608) определена с помощью HTS на платформе 454. Pk оказался первым изолятом PPV, геном которого был секвенирован с помощью HTS. Из 37572 прочтений средней длины 292 нт на референсную последовательность LV-145bt (HQ670748) картировалось 18968 прочтений (50,4%) с образованием 1 контига длиной 9758 нт и средней глубиной прочтения 500х. Этот контиг

покрывал 99,7% генома референсного изолята за исключением 31 нт на 5'-конце, которые были секвенированы с помощью 5'RACE.

Геномы новых изолятов состояли из 9786 или 9789 нт с организацией, типичной для PPV. Степень их идентичности между собой и с известными изолятами W3174, LV-141p1, LV-145bt, UKR 44189 составила 92 - 99,9% на нуклеотидном уровне. Для полипротеина степень идентичности варьировала от 96,2 до 99,9%. Наиболее консервативной (96,2 - 98,1%) оказалась нуклеотидная последовательность РІРО, а самыми консервативными белками - 6К1 и N1a. Наиболее изменчивыми оказались ген Р1 и кодируемый им продукт, степень идентичности которых составила 86,7 - 94% на нуклеотидном и 89,3 - 94,8% на аминокислотном уровнях. Таким образом, PPV-W является самым вариабельным из всех известных штаммов вируса.

Выравнивание всех доступных аминокислотных последовательностей репликазы PPV, кодируемой геном N1b, показало, что у штамма W этот белок содержит ряд уникальных замен. Четыре из них (позиции 102, 110, 149, 164, занятые, соответственно, остатками **валина, глицина, аспарагиновой кислоты и аргинина**) находятся в N-конце белка N1b, участвующего в связывании других белков репликативного комплекса (Revers and Garcia, 2015). Замена **валина** на родственный **изолейцин** обнаружена в каталитическом центре фермента (позиция 2650 в полипротеине) вблизи Mg<sup>2+</sup>-связывающего центра и мотива GDD. В изолятах штамма D мутация C2635R, локализованная вблизи мотива GDD, приводила к ухудшению накопления вируса и аттенуации симптомов инфекции на *P. mume* и *N. benthamiana* (Maеjima et al., 2020). Семь замен в позициях белка N1b 469, 483, 487, 490, 505, 508 и 509 локализованы в C-терминальном регионе, функция которого неизвестна. Возможно, указанные замены снижают точность копирования матрицы репликазой PPV-W, что приводит к усилению вариабельности геномов изолятов этого штамма.

Другим фактором изменчивости вирусных геномов является рекомбинация. Анализ выравнивания полногеномных последовательностей изолятов PPV-W с помощью программы RDP4 выявил несколько внутриштаммовых РС (Рис. 13). По меньшей мере 3 изолята (1410-1, P2-1 и PD2) являются продуктами рекомбинации с другими изолятами этого штамма. Наличие РС с высокой вероятностью поддержано всеми алгоритмами, встроенными в RDP4 (Табл. 7). Внутриштаммовая рекомбинация среди изолятов PPV-W обнаружена нами впервые. Геном W3174 является мозаичным, т.к. содержит две рекомбинантных последовательности, происходящие от штаммов M и D (Glasa et al., 2011).



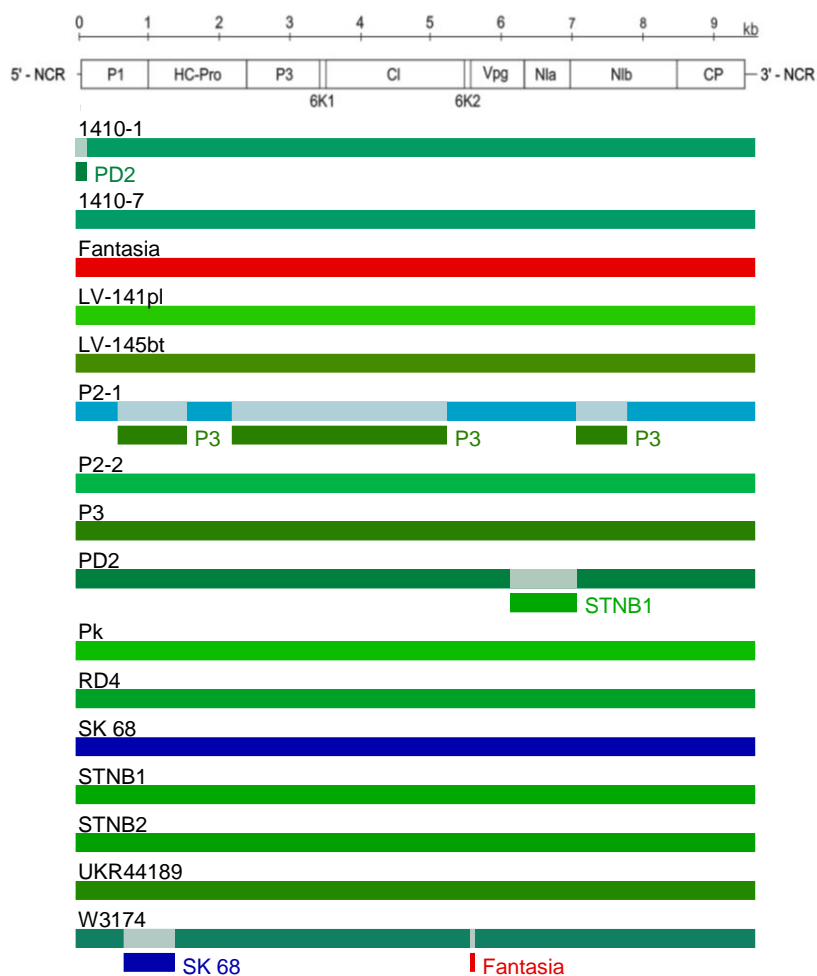


Рис. 13. Схематическое изображение рекомбинационных событий, обнаруженных при анализе выравнивания 14 полногеномных последовательностей изолятов PPV-W, изолятов штамма D (Fantasia) и штамма M (SK68) с помощью RDP4 v.69. Названия изолятов приведены поверх длинных прямоугольников. Короткие прямоугольники под ними указывают положение рекомбинантной последовательности в рекомбинантном геноме и название предполагаемого минорного родителя. Вверху схемы представлены карта генома и масштабная линейка.

Изолят 1410 был перенесен со сливы канадской (*P. nigra*) на растения *N. benthamiana* посредством механической инокуляции. В результате заражения развивалась бессимптомная, как и в *P. nigra*, системная инфекция, которая четко выявлялась с помощью ИФА и ОТ-ПЦР. Анализ БО изолята 1410 из *P. nigra* и *N. benthamiana* методом иммуноблота показал, что антитела 5В окрашивают несколько белковых зон. Верхняя зона с мол. м. около 43 кДа, очевидно, соответствует полноразмерному БО. Зоны с большей подвижностью образуются

при частичном протеолизе N-конца БО (Lain et al., 1988; Lopez-Moya et al., 1994). Распознаваемый антителами 5В универсальный эпитоп  $^{94/96}\text{DRDVDAG}^{100/102}$  расположен на стыке N-конца БО и сердцевины молекулы и не подвержен частичному протеолизу. Мол. м. БО, определенная с помощью Вестерн-блота по его электрофоретической подвижности, на несколько килодальтон превышала рассчитанную по аминокислотному составу (36,8 кДа) (Рис. 14), что указывало на возможность посттрансляционных модификаций БО.

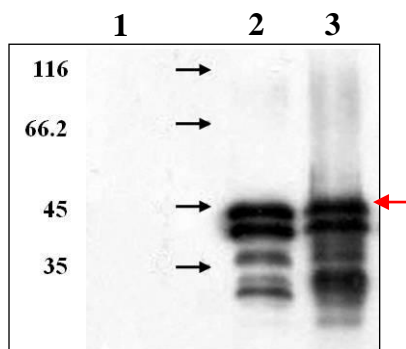


Рис. 14. Анализ белка оболочки изолята 1410 (PPV-W) методом Вестерн-блота с моноклональными антителами 5В (Agritest). 1 – незараженное растение сливы канадской (*P. nigra*); зараженные растения *N. benthamiana* (2) и *P. nigra* (3). Стрелки слева указывают положение маркеров, кДа (Thermo Scientific). Красная стрелка указывает положение полноразмерного БО.

Как отмечалось в Обзоре литературы, N-конец БО изолятов штаммов D, Res и С гликозилирован по остаткам S и T, причем электрофоретическая подвижность БО зависит от степени его гликозилирования (Hervas et al., 2020). Возможно поэтому, что одной из причин аномально низкой электрофоретической подвижности БО PPV-W является гликозилирование, которое увеличивает молекулярную массу БО за счет ковалентного присоединения углеводного компонента (N-ацетилглюкозамина). Кроме того, углеводный компонент препятствует связыванию с белком молекул додецилсульфата натрия (Werner et al., 1993), что и приводит к замедлению миграции БО при электрофорезе в денатурирующих условиях. Следует отметить, что в N-конце БО PPV-W насчитывается около 30 остатков S и T (Рис. 11), что вдвое больше, чем у штамма D.

Таблица 7. Результаты анализа внутриштаммовой рекомбинации среди 14 полногеномных последовательностей изолятов штамма W с помощью Recombination Detection Program (RDP4.69).

Номер РС*	Рекомбинант	Основной родитель	Минорный родитель	Позиции брейкпойнтов, нт		<i>P-values</i> , вычисленные 6 различными методами, встроенными в RDP4					
				Начало РС*	Конец РС*	RDP	Geneconv	Bootscan	Maxchi	Chimaera	SiScan
1	W3174	1410-7	SK68	692	1428	$4,89 \times 10^{-126}$	$1,05 \times 10^{-120}$	$5,43 \times 10^{-126}$	$8,42 \times 10^{-27}$	$2,55 \times 10^{-28}$	$3,0 \times 10^{-30}$
2	1410-1	1410-7	PD2	5'-конец	178	$1,98 \times 10^{-21}$	$3,59 \times 10^{-20}$	$1,95 \times 10^{-21}$	$9,11 \times 10^{-03}$	$1,20 \times 10^{-04}$	$4,26 \times 10^{-06}$
3	PD2	P3	STNB1	6238	7223	$2,42 \times 10^{-22}$	$5,08 \times 10^{-24}$	$2,28 \times 10^{-27}$	$1,83 \times 10^{-10}$	$7,47 \times 10^{-06}$	$1,74 \times 10^{-15}$
4	P2-1	P2-2	P3	617	1616	$8,80 \times 10^{-29}$	$1,34 \times 10^{-26}$	$8,76 \times 10^{-29}$	$2,82 \times 10^{-15}$	$4,31 \times 10^{-15}$	$8,28 \times 10^{-14}$
5	P2-1	P2-2	P3	2242	5348	$7,56 \times 10^{-38}$	$9,16 \times 10^{-33}$	$3,10 \times 10^{-34}$	$1,44 \times 10^{-23}$	$5,88 \times 10^{-23}$	$7,91 \times 10^{-30}$
6	P2-1	P2-2	P3	7196	7995	Не выявлено	$7,16 \times 10^{-28}$	$8,29 \times 10^{-31}$	$5,11 \times 10^{-12}$	$2,67 \times 10^{-11}$	$1,25 \times 10^{-11}$
7	W3174	1410-1	Fantasia	5664	5760	$2,22 \times 10^{-18}$	$2,91 \times 10^{-15}$	$9,80 \times 10^{-17}$	$4,52 \times 10^{-03}$	$1,38 \times 10^{-03}$	Не выявлено

\*РС - рекомбинационное событие.

Методом Вестерн-блота проведен анализ связывания моноклональных антител 10G7, 4A11 и 5C1, полученных при иммунизации мышей рекомбинантными пептидами N-конца БО изолята W3174 (Croft et al., 2008), с российскими изолятами этого штамма.

Все изоляты PPV-W распознавались антителами 5B, которые окрашивали несколько белковых зон (Рис. 15А).

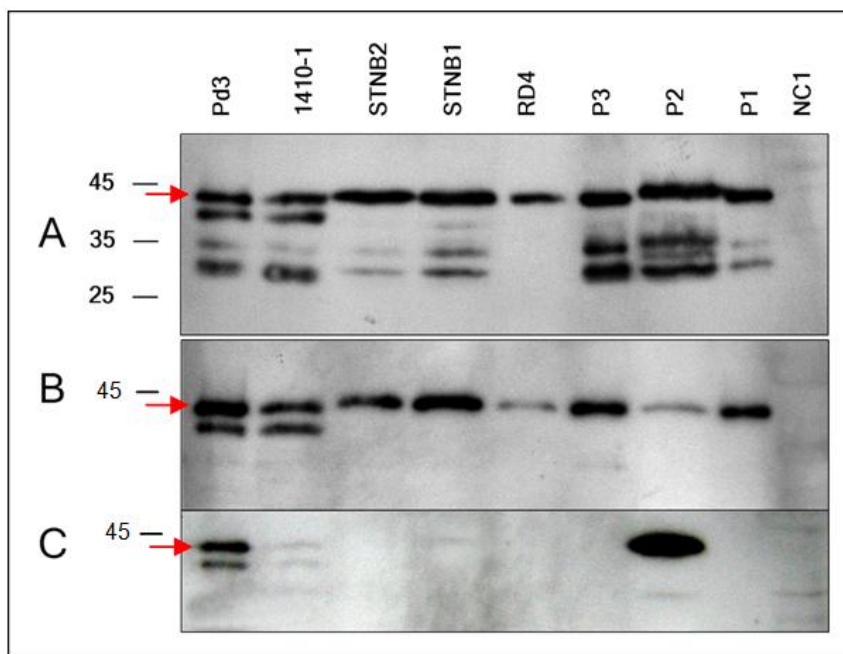


Рис. 15. Взаимодействие моноклональных антител 5B (А), 4A11 (В) и 5C1 (С) с российскими изолятами PPV-W на иммуноблоте. NC1 – отрицательный контроль (здоровая слива). Стрелки слева от блота показывают позиции белков-маркеров, кДа (Thermo Scientific). Красными стрелками отмечено положение полноразмерного БО.

Антитела 10G7 не распознавали ни один из российских изолятов. Гомологичный эпитоп у изолята W3174 представлен последовательностью <sup>2</sup>DEEDD<sup>6</sup>. Важную роль в связывании 10G7 играет также последовательность <sup>8</sup>PTIV<sup>11</sup> (Croft et al., 2008). У российских изолятов аспарагиновая кислота (D) в позиции 2 заменена на аспарагин (N), а последовательность <sup>8</sup>PTIV<sup>11</sup> отсутствует (Рис. 11). Замена D2N укорачивает последовательность из 6 отрицательно заряженных аминокислотных остатков, что может нарушать структуру эпитопа и препятствовать его распознаванию антителами 10G7. Отсутствие <sup>8</sup>PTIV<sup>11</sup> также может оказывать негативное влияние на связывание 10G7.

Эпитоп, распознаваемый антителами 4A11, представлен последовательностью <sup>46</sup>MFNPV<sup>50</sup> (Croft et al., 2008). Как видно из выравнивания аминокислотной

последовательности N-конца БО (Рис. 11), в некоторых изолятах остатки валина (V) в позиции 50 заменены на остатки изолейцина (I), а у изолята P2 аспарагин (N) в позиции 48 заменен на аспарагиновую кислоту (D). Несмотря на эти замены, антитела 4A11 распознавали все изоляты PPV-W, изученные в этом отношении (Рис. 14, В). По-видимому, обнаруженные замены не сказываются на взаимодействии 4A11 с соответствующим эпитопом.

Антитела 5C1 специфичны к эпитопу <sup>58</sup>PSVKP<sup>62</sup> (Croft et al., 2008). Его последовательность существенно варьирует (Рис. 11), что, по-видимому, сказывается на способности 5C1 распознавать большую часть новых изолятов (Рис. 14, С). В частности, замена гидрофобного остатка валина (V) в позиции 60 у W3174 полярным треонином (T) в изолятах P1 и P2, возможно, препятствует связыванию 5C1 с БО этих изолятов. Замена лизина (L) на аргинин (R) у STNB1, STNB2 and RD4 препятствует взаимодействию антител 5C1 с БО изолятов этих изолятов, но, по-видимому, облегчает их связывание с P2. Таким образом, потенциально PPV-W-специфичными могут являться моноклональные антитела 4A11. Показано, что эти антитела не распознают изоляты других штаммов вируса (Croft et al., 2008).

Изучена возможность распространения изолятов PPV-W тлями. В БО всех исследованных в нашей работе изолятов обнаружен мотив DAG, а в белке HCPro у всех изолятов с известной полногеномной последовательностью обнаружены мотивы KITS и PTK. Деревья сливы, зараженные изолятами Avang и Pulk, были колонизированы хмелевой тлей *Phorodon humuli* (Schr.), а дерево, зараженное Kp2U, - чертополоховой тлей *Brachycaudus cardui* (L.). Эти виды тли известны как переносчики PPV (Labonne et al., 1995), однако возможность переноса ими изолятов штамма W не была изучена.

Методом ОТ-ПЦР с праймерами, специфичными к PPV-W, вирус легко определялся в листьях, колонизированных тлями (рис. 16а). Однако анализ тотальной РНК из тлей, собранной с зараженных побегов, выявил вирус только в тле *B. cardui* со сливы, зараженной изолятом Kp2U (рис. 16б). Несмотря на это, инокуляция растений *N. benthamiana* тлей *Ph. humuli* с деревьев сливы, зараженных изолятами Avang и Pulk, и тлей *B. cardui* с дерева, зараженного Kp2U, приводила к инфицированию индикаторных растений. Методом ОТ-ПЦР вирус был обнаружен как в инокулированных, так и в неинокулированных листьях, что указывало на развитие системной инфекции и, следовательно, на возможность переноса изолятов PPV-W обоими видами тли (рис. 16в). Доля зараженных индикаторных растений составила для Avang – 3 растения из 5, для Pulk – 4 из 6, и для Kp2U – 5 из 5 инокулированных. Возможно, высокая эффективность передачи изолята Kp2U является

следствием существенно большего количества вируса в *B. cardui* (рис. 16б). Высокое содержание PPV в переносчике не характерно для непersistентного способа передачи вируса и нуждается в дальнейшем изучении. Следует отметить, что при векторной передаче вируса инфекция PPV-W в *N. benthamiana* оказалась полностью бессимптомна, как и при механическом заражении растений этого вида.

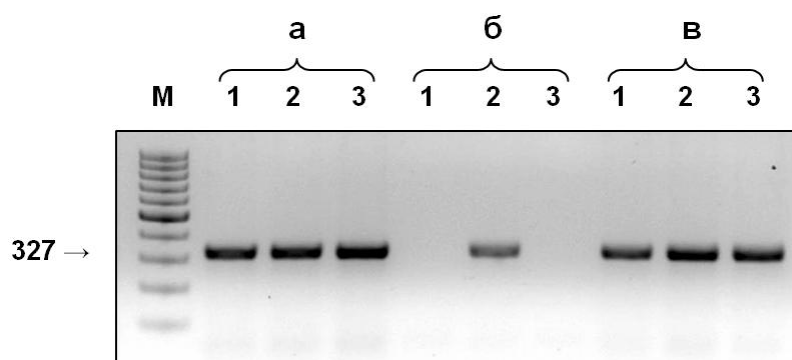


Рис. 16. Определение PPV в листьях сливы, колонизированных тлями (а), в тлях (б) и в системных листьях *N.benthamiana* через 3 недели после инокуляции тлями (в), с помощью ОТ-ПЦР. Изоляты: Avang (1), Кр2U (2), Pulk (3). Электрофорез в 2%-ном геле агарозы. Стрелка указывает положение специфического продукта ПЦР размером 327 пар нуклеотидов, генерируемого с праймерами 3174SP-F3/R1. М – маркеры GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

Впервые изучена возможность передачи изолятов PPV-W через семена. Методами DAS-ELISA и ОТ-ПЦР были проанализированы 47 растений сливы *P. domestica*, выращенных из семян с дерева, зараженного изолятом Pk. Ни в одном из сеянцев вирус выявить не удалось. Типичные симптомы вирусной инфекции не развивались. По-видимому, изоляты PPV-W семенами сливы не передаются.

С момента обнаружения в начале 2000-х годов в Канаде и США штамм W считался редким и уникальным. Изучение этого штамма в России радикально изменило представления об его распространенности. В данной работе обнаружено 35 новых изолятов PPV-W. Кроме того, PPV-W был выявлен на сливе в Липецкой, Воронежской и Ростовской областях и на войлочной вишне в Московской области (Приходько и соавт., 2011). Эти результаты указывают на повсеместное распространение штамма W в Европейской России. Широкое распространение PPV-W в России отчетливо контрастирует с его единичными находками за ее пределами. При этом следует отметить, что из семи изолятов, обнаруженных вне России, по крайней мере шесть (а, возможно, и все) были найдены или происходят из стран бывшего

СССР (James et al., 2003; Glasa et al., 2011; Mavrodieva et al., 2013; Dallot et al., 2019). Весьма вероятно, что штамм W возник и распространился преимущественно в России.

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей показал, что PPV-W является самым изменчивым штаммом вируса. Это выражается в высоком уровне внутриштаммовой генетической изменчивости, нехарактерной для других штаммов PPV, наличии двух типов БО (длиной 330 и 331 аминокислотных остатков) и изменчивости сайтов протеолиза полипротеина. Изоляты PPV-W могут отличаться по биологическим свойствам. Так, изолят RD4 обнаружен нами на войлочной вишне в природных условиях. Однако попытки заразить войлочную вишню изолятом UKR44189 в лабораторных условиях оказались безуспешными (Mavrodieva et al., 2013). Высокий уровень внутриштаммовой изменчивости может указывать на длительную эволюцию изолятов этого штамма на территории Европейской России.

#### **4.4. Штаммы PPV, адаптированные к вишне ("вишневые штаммы").**

С момента открытия штамма С в начале 90-х годов прошлого века считалось, что вишню (*P. cerasus*) и черешню (*P. avium*) могут заражать только изоляты этого штамма. В данной работе мы открыли на вишне два новых штамма вируса, которые были названы PPV-CR (Cherry Russian) и PPV-CV (Cherry Volga).

##### **4.4.1. Штамм CR.**

В 2011 г. при обследовании зеленых насаждений в г. Москве были обнаружены несколько дикорастущих деревьев вишни с типичными симптомами шарки на листьях. В соответствии с локализацией этих деревьев, взятые с них образцы были обозначены Кр8-1, Кр8-1U, Кр8-2U, Кр8-2D, Fl-1, Fl-2, Fl-3, Pul-1 и Pul-DS. При анализе экстрактов из симптоматичных листьев в DAS-ELISA была зафиксирована четкая положительная реакция, а в ОТ-ПЦР с праймерами P1/P2 получены продукты ожидаемого размера 243 пн, что подтверждало зараженность образцов PPV. Вместе с тем, эти изоляты не распознавались в TAS-ELISA антителами 5B, специфичными к универсальному эпитопу БО, и в ПЦР с праймерами к штаммам D, M, Res, W и С. Можно было предположить, что найденные изоляты являются атипичными представителями штамма С или принадлежат к неизвестному штамму вируса.

3'-концевые последовательности московских изолятов были амплифицированы с использованием праймеров р84С/4СР1 (Табл. 2) и продукты ПЦР размером 1200 пн были секвенированы. Установлено, что, как и у известных изолятов штамма С, ген БО состоял из 996 нт и кодировал белок размером 332 аминокислотных остатка. Последовательности гена

БО новых изолятов оказались идентичны на 99,2 – 100%. В то же время, обнаружена высокая степень их дивергенции от известных штаммов РРV. Степень идентичности гена БО варьировала от 62,1% при сравнении со штаммом ЕА до 85,2% при сравнении с РРV-С, что, в случае РРV, характерно для междуштамбовых различий. Результаты филогенетического анализа гена БО показали, что московские изоляты ("Atypical isolates") входят в суперкластер, образованный изолятами штаммов W и С, однако группируются отдельно от них и от всех других известных штаммов (Рис. 17), что также указывало на их возможную принадлежность к неизвестному ранее штамму вируса.

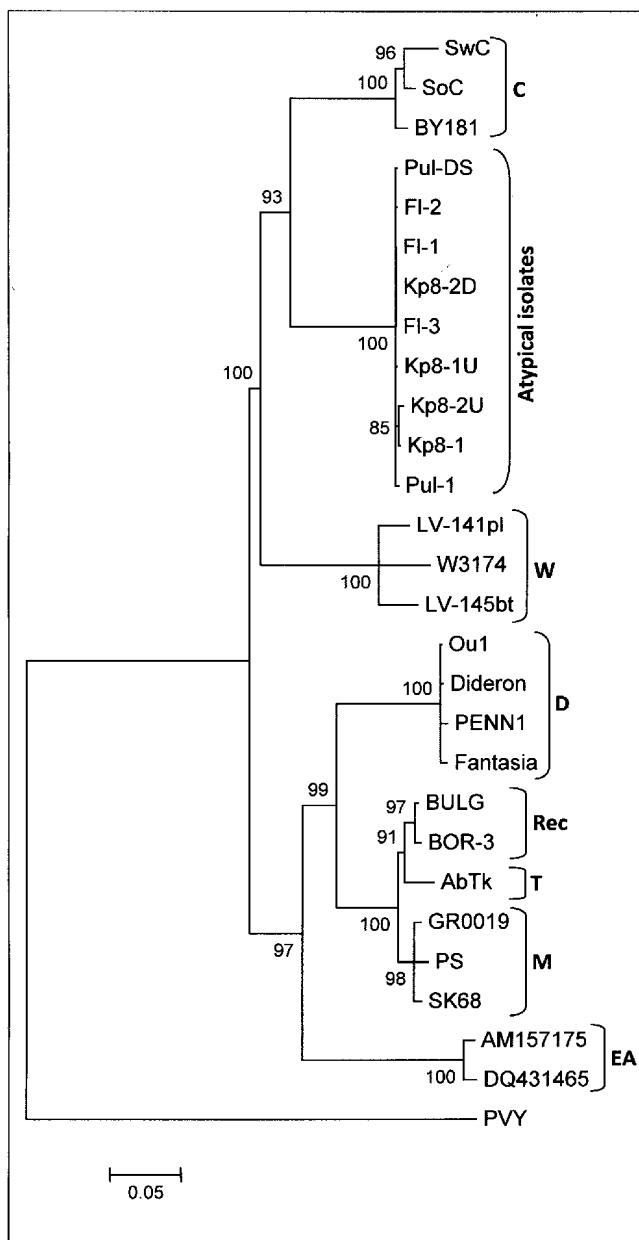


Рис. 17. Филогенетический анализ гена белка оболочки 9 атипичных вишневых изолятов ("Atypical isolates") и изолятов РРV, представляющих известные штаммы вируса.



Дерево реконструировано методом присоединения соседей с помощью программы MEGA7. Значения бутстрэп-анализа (>80%) указаны рядом с узлами. Масштабная черта показывает число замен на 1 нуклеотид. Номера последовательностей, использованных в анализе: Y09851 (SwC), AY184478 (SoC), HQ840518 (BY181), HQ670746 (LV-141pl), AY912055 (W3174), HQ670748 (LV-145bt), AB545926 (Ou1), X16415 (Dideron), AF401295 (PENN-1), AY912056 (Fantasia), GU461889 (BULG), AY028309 (BOR-3), EU734794 (AbTk), FM955843 (GR0019), AJ243957 (PS), M92280 (SK68). Для изолятов штамма PPV-EA номера показаны на ветвях дерева. Последовательность гена БО потивируса *Y* картофеля (PVY) (X12456) использована в качестве филогенетической аутгруппы.

С помощью HTS на платформе 454 были секвенированы полногеномные последовательности московских изолятов Кр8-1, Кр8-2U, Fl-1, Pul-1 и Pul-DS. Прочтения были собраны в контиги, которые покрывали весь геном референсного изолята BY181 (HQ840518) за исключением 28-58 нт на 5'-конце генома со средней глубиной покрытия 48x - 216x. 5'-терминальный участок генома был секвенирован с помощью 5'-RACE. Последовательности гена БО, определенные ранее путем секвенирования методом Сэнгера, оказались идентичными полученным при HTS.

Геномы изолятов Fl-1, Кр8-1, Кр8-2U и Pul-DS имели структуру, типичную для PPV, и состояли из 9792 нт, без учета поли(А) последовательности на 3'-конце генома. Геном Pul-1 состоял из 9791 нт вследствие делеции в 3'-NCR. Геномы новых вишневых изолятов оказались полностью коллинеарны известным изолятам штамма С, но были короче на 3 нт вследствие делеции триплета ААТ в гене NIa (позиции 6865 – 6867). Московские изоляты оказались идентичны между собой на 99,5 - 99,7% на нуклеотидном и 99,7 - 99,9% на аминокислотном уровнях. Степень идентичности с полногеномными последовательностями изолятов штаммов EA, D, Res, M, W и С составила 77 – 85%. Филогенетический анализ полногеномных последовательностей московских изолятов показал, что они кластеризуются отдельно от штамма С, образуя вместе с ним группу изолятов, адаптированных к вишне (Рис. 18). Таким образом, на основании филогенетического анализа полногеномных последовательностей, степени их идентичности с полногеномными последовательностями изолятов других штаммов и распространенности в насаждениях вишни, новые московские изоляты следует считать представителями нового штамма вируса.

Одновременно с нашей работой независимой группой исследователей были обнаружены необычные изоляты PPV на вишне в Самарской и Саратовской областях (Glasa et al., 2013). Четырнадцать изолятов были найдены в плодоносящих садах, в сортовых коллекциях, на дачных участках и дикорастущих деревьях на расстоянии до 200 км один от

другого. Полногеномные последовательности трех из них были секвенированы. Оказалось, что они только на 78 – 84% идентичны геномам изолятов известных штаммов вируса. Было предложено выделить эту группу в новый штамм PPV-CR (Cherry Russian). Разработаны праймеры CR8597F/CR9023R для идентификации изолятов нового штамма (Табл. 3). При использовании этих праймеров для анализа наших образцов образовывался продукт ПЦР ожидаемого размера 427 пн. Таким образом, и московские, и обнаруженные в Среднем Поволжье необычные вишневые изоляты PPV являются представителями нового штамма PPV-CR.

При сравнении полных геномов и полипротеинов оказалось, что, в среднем, московские изоляты PPV-CR идентичны изолятам из Саратова и Самары (RU-17sc, RU-18sc, RU-30sc) на 98,8% на нуклеотидном и 99,4% на аминокислотном уровнях, что указывает на высокую консервативность и генетическую стабильность штамма CR. Несмотря на высокое сходство геномов, при филогенетическом анализе московские и волжские изоляты формировали четко обособленные кластеры (Рис. 18). При анализе полипротеинов 8 изолятов этого штамма самым вариабельным оказался белок 6K2 (94,3 – 100% идентичности), за ним следовали N-конец БО (96,1 – 100%), VPg (97,9 – 100%) и P1 (98,1 – 100% идентичности).

Были изучены некоторые биологические свойства московских изолятов штамма CR. Анализ предсказанных последовательностей БО показал, что в универсальном эпитопе остатки аспарагиновой кислоты (D) в позиции 96 заменены на остатки глутаминовой кислоты (E). Такая замена может препятствовать взаимодействию антител 5B с гомологичным эпитопом и объяснять отрицательные результаты TAS-ELISA при определении этих изолятов. TAS-ELISA с антителами 5B повсеместно применяется с 1994 года (Cambra et al., 1994) и считается самым надежным методом иммунохимической диагностики этого вируса (García et al., 2014). Однако, как выяснилось в нашей работе, изоляты PPV с мутацией D96E не распознаются антителами 5B в TAS-ELISA.

Из 14 волжских изолятов мутация D96E обнаружена в 12, и такие изоляты также не выявлялись в TAS-ELISA с антителами 5B. Понижение pH экстракта до 6,0 в ряде случаев способствовало выявлению изолятов вируса с мутацией D96E и могло указывать на определенную роль конформации БО в распознавании универсального эпитопа антителами 5B (Glasa et al., 2013). Однако в наших экспериментах антитела 5B не распознавали изоляты вируса с мутацией D96E не только в TAS-ELISA, но и на иммуноблоте, что, по-видимому, исключает влияние конформации БО на его взаимодействие с антителами 5B.

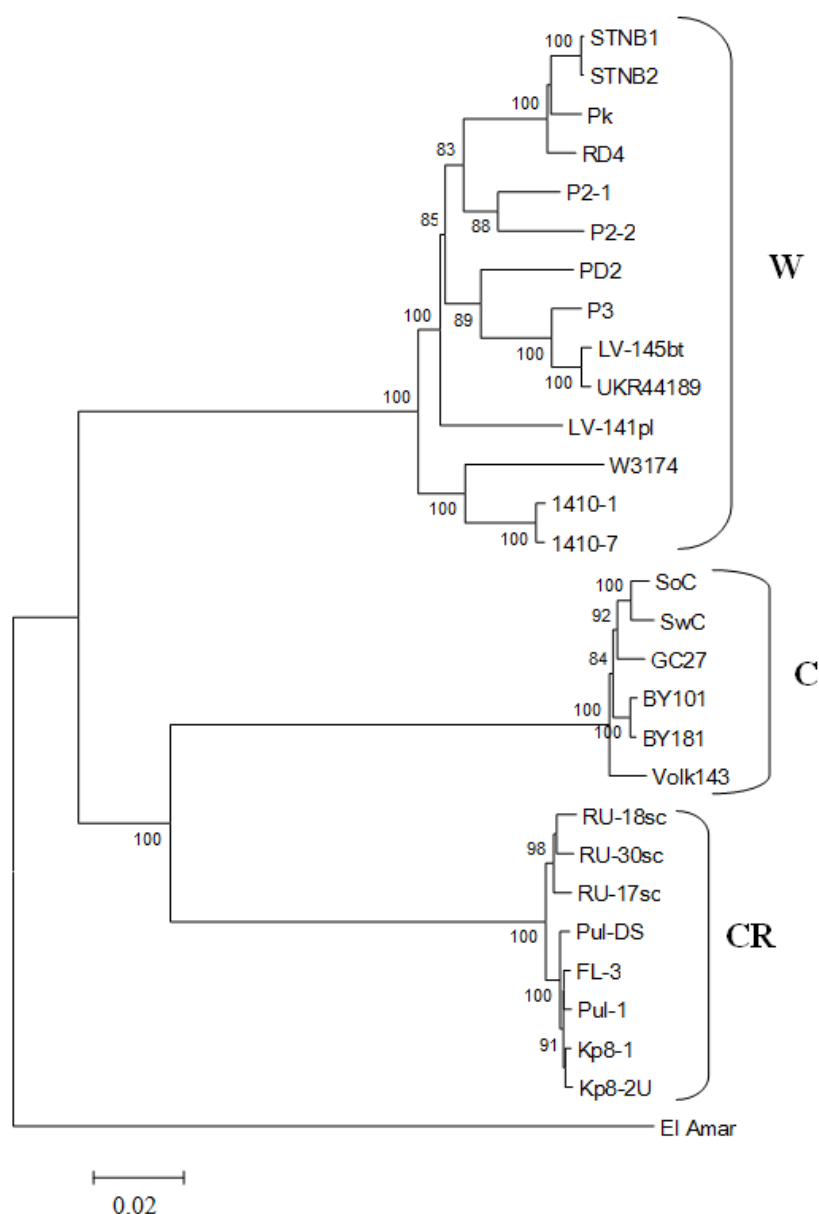


Рис. 18. Филогенетический анализ полногеномных последовательностей изолятов PPV штаммов CR, C и W. Дерево реконструировано методом присоединения соседей с помощью программы MEGA7. Значения бутстрэп-анализа (>80%) указаны рядом с узлами. Масштабная черта показывает число замен на 1 нуклеотид. Номера последовательностей, использованных в анализе: HG916857 (STNB1), HG916858 (STNB2), KC347608 (Pk), HG916856 (RD4), HG916860 (P2-1), LN852400 (P2-2), HG916859 (PD2), HG916861 (P3), HQ670748 (LV-145bt), JN596110 (UKR 44189), HQ670746 (LV-141pl), AY912055 (W3174), HG916863 (1410-1), HG916862 (1410-7), AY184478 (SoC), Y09851 (SwC), KY221840 (GC27), HQ840517 (BY101), HQ840518 (BY181), KJ787006 (Volk143), KC020125 (RU-18sc), KC020126 (RU-30sc), KC020124 (RU-17sc), MG736816 (Pul-DS), MG736812 (Fl-3), MG736815 (Pul-1), MG736813 (Kp8-1), MG736814 (Kp8-2U). Фигурными скобками объединены изоляты,

относящиеся к определенному штамму. Последовательность изолята PPV-EA (AM157175) использована в качестве филогенетической аутгруппы.

Для выполнения вестерн-блота были использованы поэтому поликлональные кроличьи антитела к PPV (Agdia). Мол. м. БО ряда изолятов PPV-CR, определенная методом Вестерн-блота с поликлональными антителами, составила около 41 кДа, что значительно выше массы, рассчитанной по аминокислотному составу (36,8 кДа) (Рис. 19).

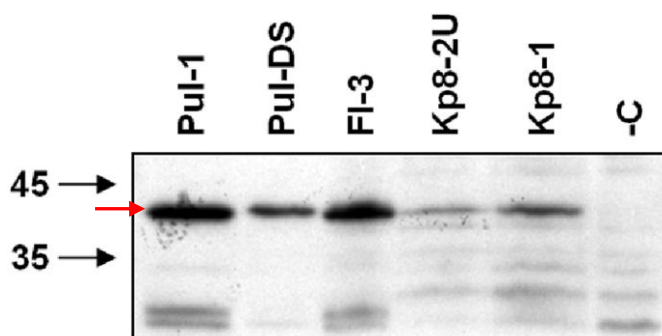


Рис. 19. Анализ белка оболочки (БО) московских изолятов PPV с помощью Вестерн-блота с поликлональными антителами к PPV (Agdia). -С – отрицательный контроль из незараженной вишни. Черные стрелки указывают положение маркеров молекулярной массы, кДа (Thermo Scientific). Красная стрелка указывает положение полноразмерного БО.

Для московских изолятов характерны типичные симптомы шарки в виде хлоротических колец неправильной формы на листьях зараженных растений. В Поволжье наблюдали иные и более разнообразные симптомы: деформацию и обесцвечивание листьев, прижильковый хлороз, арабески (Glasa et al., 2013). Хотя симптомы инфекции зависят от многих факторов (возраста, физиологического состояния, сорта растения, агроклиматических условий), нельзя исключить, что различия симптомов, индуцируемых московскими и волжскими изолятами, могут быть обусловлены генетическими различиями между волжскими и московскими изолятами PPV-CR.

Все московские изоляты обнаружены на дикорастущих (непривитых) деревьях, показывая, что в обследованных насаждениях они распространяются через семена или тлями. Для изучения возможности переноса через семена спелые плоды собирали с деревьев, зараженных изолятами Fl-1, Fl-3 и Kp8-1U. Специфические симптомы шарки на плодах отсутствовали, но вирус легко выявлялся в кожице плодов с помощью ОТ-ПЦР с праймерами P1/P2. После стратификации семян получено 66 сеянцев, каждый из которых

был проверен с помощью DAS-ELISA или ОТ-ПЦР на присутствие PPV через 4 мес. после прорастания семян. Ни в одном из исследованных образцов не обнаружено ни характерных симптомов на листьях, ни положительной реакции в ИФА и ОТ-ПЦР. По-видимому, PPV-CR не передается через семена вишни. Как отмечалось в Обзоре литературы, PPV не передается через семена ряда косточковых культур. В данной работе мы впервые показали отсутствие передачи вируса через семена вишни.

На зараженных деревьях вишни были обнаружены тли вида *M. cerasi*, колонизирующие молодые побеги. Для изучения возможности переноса вируса тлями бескрылых особей с побегов вишни, зараженной изолятами Fl-3 или Kp8-2U, переносили на 4-х месячные сеянцы вишни и на растения *N. benthamiana* и *N. clevelandii* в возрасте 8 листьев. При анализе растений обоих видов табака и сеянцев вишни соответственно через 2 и 11 месяцев после инокуляции ни в одном случае не были обнаружены ни симптомы инфекции, ни положительные реакции в ОТ-ПЦР с праймерами P1/P2. Вирус также не был обнаружен при анализе выделенной из тли тотальной РНК с помощью ОТ-ПЦР с праймерами P1/P2. По-видимому, изоляты PPV-CR тлей *M. cerasi* не переносятся.

Таким образом, в двух регионах Европейской России на растениях вишни обнаружены изоляты PPV, относящиеся к новому штамму PPV-CR. Полученные результаты впервые показали, что вишня может заражаться не только PPV-C, но и другими штаммами вируса. Места находок этих изолятов отстоят один от другого на сотни километров, что могло бы свидетельствовать о широком распространении нового штамма в Европейской России. Однако, вплоть до настоящего времени, другие изоляты этого штамма ни в России, ни в зарубежной Европе обнаружить не удалось.

#### **4.4.2. Штамм CV.**

В 2015 году в Республике Татарстан на дикорастущих кустах и корневой поросли вишни с симптомами шарки на листьях обнаружены изоляты PPV, названные, соответственно, Tat-2 и Tat-4. При анализе экстрактов из симптоматичных листьев наблюдали четкие положительные реакции в DAS-ELISA с поликлональными антителами к PPV и в ОТ-ПЦР с праймерами P1/P2, что подтверждало зараженность образцов PPV. В TAS-ELISA со штаммспецифичными моноклональными антителами Tat-2 распознавался только антителами AC к штамму C, а Tat-4 не реагировал ни с одними штаммспецифичными антителами. В ОТ-ПЦР Tat-2 и Tat-4 распознавались только праймерами P1/PD к штамму D с образованием типичного для PPV-D продукта размером 198 пн. Таким образом, результаты определения штамма с помощью иммунохимических и молекулярных тестов противоречили

один другому, и оба изолята, хотя и найденные на вишне, не принадлежали, по-видимому, ни к PPV-C, ни к PPV-CR. Кроме того, геномы Tat-2/4 не амплифицировались с праймерами N1bF/4CPR1 или p84C/4CPR1, используемыми для амплификации 3'-концевых участков генома изолятов штаммов D, C или CR (Табл. 2).

Поэтому для амплификации 3'-терминальной последовательности Tat-2 и Tat-4 (с целью определения таксономического статуса новых изолятов) были использованы другие пары праймеров. В качестве смысловых использовали potyvirus primer 2 (Gibbs and Mackenzie, 1997), N1b2F (Zheng et al., 2010) и CVseq, таргетирующие ген N1b, а в качестве антисмысловых - 4CPR1 и заново написанный праймер tat2cpR, таргетирующие, соответственно, 3'-NCR и (Nter)CP участки генома (Табл. 2). В результате секвенирования продуктов ПЦР были собраны 3'-концевые последовательности изолятов Tat-2 и Tat-4 длиной 1747 нт. Их идентичность между собой составила 99,5%, а с изолятами штаммов C и CR – от 75 до 96% в зависимости от участка генома. Наибольшие различия обнаружены в С-терминальной последовательности N1b и N-терминальной последовательности гена БО. С-концевой участок гена БО и 3'-NCR оказались более консервативны.

Для объяснения результатов ОТ-ПЦР при определении штамма Tat-2 и Tat-4 сравнивали последовательности PPV-C, -CR и -D-специфичных праймеров и таргетируемые ими участки генома (Табл. 8). Для пары PPV-CR- и всех трех пар PPV-C-специфичных праймеров обнаружено от 6 до 14 несовпадений нуклеотидов в соответствующих участках генома, что, видимо, и является причиной нераспознавания Tat-2/4 праймерами к штаммам вируса, адаптированным к вишне. Напротив, для прямого PPV-D-специфичного праймера PD обнаружено только 2 несовпадения, и ни одного не выявлено между обратным праймером P1 и таргетируемой им последовательностью изолятов Tat-2 и Tat-4.

Результаты ИФА, полученные при штаммотипировании Tat-2/4 с помощью моноклональных антител, частично получили объяснение при анализе предсказанных аминокислотных последовательностей N-конца БО. Вместо PPV-D-специфичного эпитопа <sup>56</sup>РАТКР<sup>60</sup> (Candresse et al., 2011), геномы Tat-2/4 содержат последовательность <sup>59</sup>PNVRP<sup>63</sup>, которая может не распознаваться антителами 4DG5. Причина отсутствия реактивности Tat-4 с антителами АС не установлена, поскольку PPV-C-специфичный эпитоп не картирован.

Полногеномные последовательности Tat-2 и Tat-4 определены посредством HTS на платформе Illumina. Прочтения каждого изолята были собраны в один контиг, покрывающий полногеномные референсные последовательности BY181 (PPV-C) или Pul-DS (PPV-CR) практически полностью, за исключением 52 - 73 нт на 5'-конце генома, со средней глубиной покрытия 95x - 260x. Геномы длиной 9792 нт оказались коллинеарны изолятам штамма C, но

были короче на 3 нт вследствие делеции одного триплета в гене NIa (позиции 6865 – 6867). Интересно отметить, что эта делеция располагалась в том же месте, что и у изолятов штамма CR, что свидетельствует о близком родстве Tat-2/4 с PPV-CR в этом участке генома (гене NIa). На нуклеотидном и аминокислотном уровнях Tat-2 и Tat-4 идентичны между собой на 99,4 и 99,7%, соответственно. Сходство с другими штаммами PPV составило 77 - 83% для геномной РНК и 88 – 93% для полипротеина (Табл. 9). При филогенетическом анализе Tat-2 и Tat-4 группировались с изолятами штаммов С и CR, образуя при этом с вероятностью 100% отдельную кладу в кластере изолятов, адаптированных к вишне (Рис. 20).

Полногеномная последовательность Tat-2, так же как и последовательности большинства генов, оказались наиболее родственны изолятам штамма С (Табл. 9). Та же зависимость прослеживается и для аминокислотных последовательностей. Вместе с тем, 5'-NCR, NСPro и NIa изолята Tat-2 ближе к соответствующим последовательностям PPV-CR. Из всех генов РIРО наиболее консервативен на нуклеотидном и наиболее вариабелен на аминокислотном уровне, указывая на то, что большинство мутаций в этом гене несинонимичны.

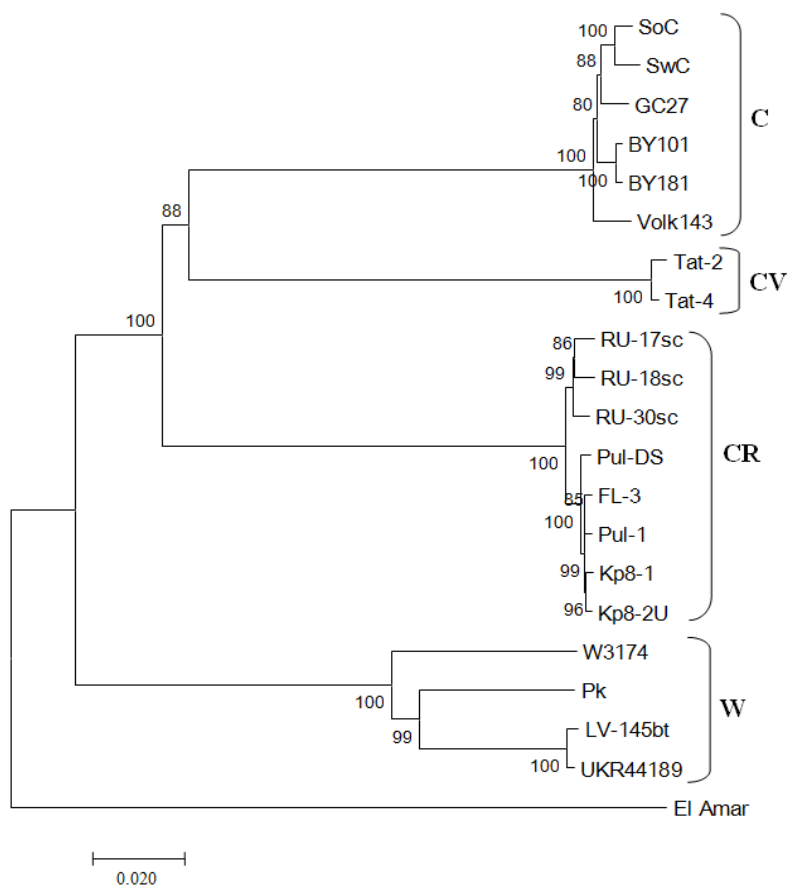


Рис. 20. Филогенетический анализ полногеномных последовательностей изолятов РРV штаммов CV, CR, C и W. Дерево реконструировано методом присоединения соседей с помощью программы MEGA7. Значения бутстрэп-анализа (>80%) указаны рядом с узлами. Масштабная черта показывает число замен на 1 нуклеотид. Номера последовательностей, использованных в анализе: AY184478 (SoC), Y09851 (SwC), KY221840 (GC27), HQ840517 (BY101), HQ840518 (BY181), KJ787006 (Volk143), MF447179 (Tat-2), MF447180 (Tat-4), KC020124 (RU-17sc), KC020125 (RU-18sc), KC020126 (RU-30sc), MG736816 (Pul-DS), MG736812 (FI-3), MG736815 (Pul-1), MG736813 (Kp8-1), MG736814 (Kp8-2U), AY912055 (W3174), KC347608 (Pk), HQ670748 (LV-145bt), JN596110 (UKR 44189). Фигурными скобками объединены изоляты, относящиеся к определенному штамму. Последовательность изолята РРV-ЕА (AM157175) использована в качестве филогенетической аутгруппы.



Таблица 8. Несовпадения между вирус- и штаммспецифичными праймерами и таргетируемыми ими последовательностями геномов изолятов Tat-2 и Tat-4.

Изолят	Праймеры, специфичные к штамму С			
	<b>HsoC-1up (+)</b> ТААСААТГСТГГГГАТГАГСТС	<b>HsoC-1dn (-)</b> ССАГТАГТГАСААГТССАТ	<b>SoC-2up (+)</b> ТССАССАТТСССАААТСТГ	<b>SoC-2dn (-)</b> ГАГГААГГАТСГАГАТГТА
Tat-2	С.Г..Г..Т...А..С.....	...АС.АС.....С....	А.....Г.ГС...	А.....С..Т
Tat-4	С.Г..Г..Т...А..С..А...	...АС.АС.....С....	А.....Г.ГС...	А.....С..Т
	Праймеры, специфичные к штамму С		Праймеры, специфичные к штамму CR	
	<b>M10-5' (+)</b> GGGAAATGATGACGACGТААСТСТ	<b>M11-3' (-)</b> АТТСТСГТАТГГГГТААТТГ	<b>CR8597F (+)</b> АТГАТГТГАСГТТАГТГГАС	<b>CR9023R (-)</b> ГТТГАССТГТСТААСАСАСГА
Tat-2	...G.....ТА.....Т.	.....А.....Т..G....	..А.С..А..Т..Г..Т..Т	..С...ТТ...G.....ГА..
Tat-4	...GG.....ТА.....Т.	.....А.....Т..G....	..А.С..А..Т..Г..Т..Т	..С...ТТА..А.....ГА..
	Праймеры, специфичные к штамму D		Праймеры, специфичные к PPV	
	<b>PD (+)</b> СТТСААСГАСАСССГТАСГГ	<b>P1 (-)</b> GGGAGTGTAGTGGTCTCGGT	<b>P2 (+)</b> САГАСТАСАССТСГССАГА	<b>P1 (-)</b> GGGAGTGTAGTGGTCTCGGT
Tat-2	.С.....А..	.....	....Т.....Т...	.....
Tat-4	.С.....А..	.....	....Т.....Т...	.....

1) "+" - прямой (смысловой) праймер, "-" - обратный (антисмысловой) праймер.

2) Для обратных праймеров представлены комплементарные последовательности в смысловой ориентации.

Таблица 9. Идентичность (%) на нуклеотидном (верхняя строка) и аминокислотном (нижняя строка) уровнях между различными участками генома изолята Tat-2 и представителями штаммов C, CR, W, D, M, Rec и EA.

Изолят/Номер в GenBank	Штамм	5' NCR*	P1	HcPro	P3	PIPO	6K1	CI	6K2	VPg	NIa	NIb	CP	3' NCR*	Весь геном	Полипротеин
BY181 (HQ840518)	C	81	81 90	80 93	86 93	91 82	88 98	86 99	82 91	84 96	79 90	80 92	86 93	95	83	93
RU-17sc (KC020124)	CR	83	81 90	82 95	81 88	87 73	83 92	84 96	81 87	84 95	80 94	80 91	86 92	95	83	93
LV-145bt (HQ670748)	W	70	75 79	81 91	80 87	87 78	81 92	81 95	74 77	81 91	78 90	80 91	82 83	93	80	89
Fantasia (AY912056)	D	62	72 78	79 91	76 81	82 72	80 90	78 95	80 85	78 88	77 91	77 89	79 82	94	76	88
SK68 (M92280)	M	62	72 79	79 91	76 81	81 69	76 90	80 94	79 85	78 89	77 89	78 89	80 84	93	78	88
BOR-3 (AY028309)	Rec	64	72 77	79 91	77 82	82 73	81 90	78 95	81 85	77 89	78 91	78 91	79 84	92	78	89
EA-2005 (AM157175)	El Amar	66	73 80	80 90	77 83	84 72	78 94	78 95	72 81	75 87	77 91	76 90	78 82	93	77	88

\*) NCR (non-coding region) - нетранслируемый участок генома.

Для идентификации новой группы изолятов разработаны две пары праймеров, таргетирующих гены P1 и БО (Табл. 3). С их помощью на корневой поросли вишни и на корнесобственных деревьях вишни сорта Морель Ранняя методом ОТ-ПЦР были выявлены еще 3 близкородственных изолята Tat-36, Tat-39 и Tat-49 (Рис. 21). Следует отметить, что эти изоляты распознавались также праймерами P1/PD к штамму D, что, видимо, является характерной чертой этой группы изолятов. Гены БО Tat-2, -4, -36, -39, -49, амплифицированные с праймерами CVseq/4CPR1 (Табл. 2), оказались идентичны, в среднем, на 99,5 и 99,1% на нуклеотидном и аминокислотном уровнях, соответственно, что также указывает на их принадлежность к одной группе. Так же как и Tat-2/4, изоляты Tat-36, Tat-39 и Tat-49 содержат в N-конце БО последовательность  $^{59}\text{PNVRP}^{63}$  и не распознаются в TAS-ELISA антителами 4DG5, специфичными к штамму D.

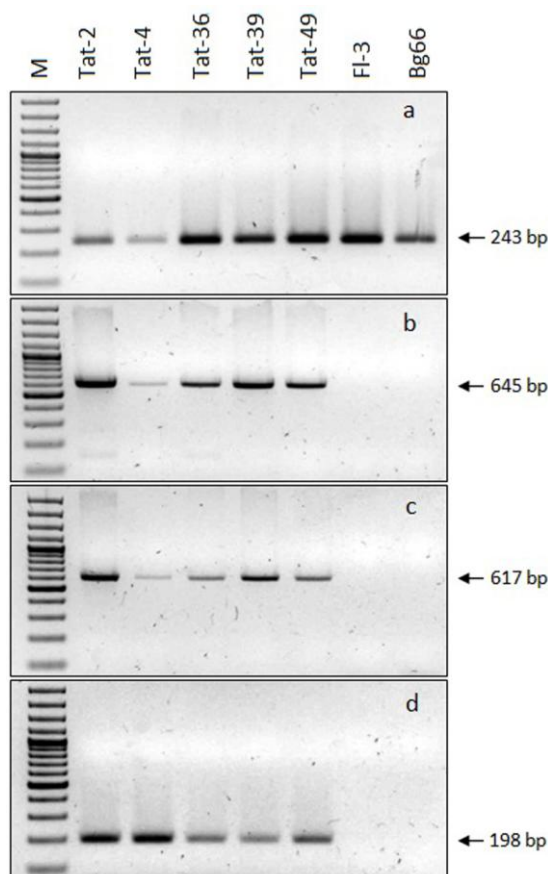


Рис. 21. Идентификация изолятов штамма CV с помощью ОТ-ПЦР с PPV-специфичными праймерами P1/P2 (a) и CV-специфичными праймерами CV-P1F/CV-P1R1 к гену P1 (b), CV-специфичными праймерами CV-NIbF/CV-CPR1 к (Cter)NIb-(Nter)CP участку генома (c), и праймерами P1/PD к штамму D (d). M - GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder (Fermentas). Стрелки указывают положение специфических продуктов ПЦР и их размер. Изоляты FL-3 (штамм CR) и Bg66 (штамм C) представлены в качестве контролей.

Мол. м. БО ряда изолятов PPV-CV, определенная методом Вестерн-блота с антителами 5В, составила около 41 кДа, что значительно выше массы, рассчитанной по аминокислотному составу (36,8 кДа) (Рис. 22).

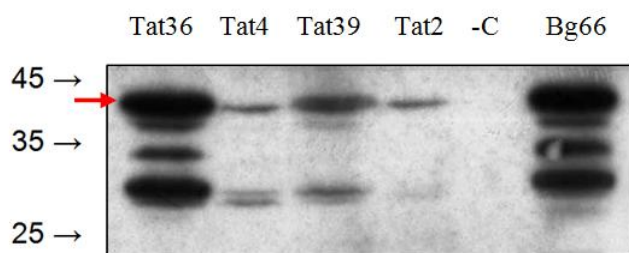


Рис. 22. Анализ белка оболочки (БО) изолятов Tat-2, Tat-4, Tat-36 и Tat-39 с помощью Вестерн-блота с антителами 5В. -С – незараженная вишня (отрицательный контроль). Черные стрелки указывают положение маркеров молекулярной массы, кДа (Thermo Scientific). Красная стрелка указывает положение полноразмерного БО.

На основании анализа полногеномных последовательностей и распространенности в природе можно утверждать, что изоляты Tat-2, Tat-4 и, видимо, близкие к ним Tat-36, Tat-39 и Tat-49 представляют собой новый штамм вируса, для которого предложено название CV (Cherry Volga).

Все изоляты нового штамма найдены на территории Татарской зональной опытной станции на расстоянии не более 1 км один от другого. В других насаждениях вишни в России изоляты штамма CV на сегодняшний день не обнаружены.

#### 4.4.3. Штамм С.

В трех географически отдаленных регионах Европейской России (Ленинградской области, Москве и Татарстане) выявлено 40 новых изолятов PPV-C (Табл. 1). Один изолят (Ka15) обнаружен на войлочной вишне. Хотя экспериментально войлочную вишню удавалось заразить изолятом SoC (PPV-C) (Damsteegt et al., 1997), в природе на этом хозяине PPV-C обнаружен впервые. Следует отметить, что симптомы PPV-C на войлочной вишне выглядят так же, как и симптомы изолятов штаммов D и W на этом виде растений (Рис. 1) и резко отличаются от характерных для изолятов PPV-C на вишне обыкновенной. Согласно результатам TAS-ELISA с моноклональными антителами AC и ОТ-ПЦР с тремя парами PPV-C-специфических праймеров (Табл. 3), все эти изоляты принадлежали к штамму С. Результаты штаммотипирования с помощью иммунохимических и молекулярных тестов были подтверждены при секвенировании (Cter)NIb-CP-3'-NCR участка генома, амплифицированного с праймерами p84C/4CPR1 (Табл. 2). Полученные результаты указывают на широкое распространение штамма С на вишне в Европейской России.

При анализе аминокислотных последовательностей обнаружена высокая частота мутации D96E в универсальном эпитопе БО. Из 40 исследованных изолятов она выявлена у 19 (47,5%). Ранее мутация D96E была выявлена у штамма CR. У изолятов штамма С она обнаружена впервые. Как и в случае штамма CR, изоляты PPV-С с такой мутацией, как правило, не распознавались антителами 5В в TAS-ELISA. Исключением оказались изоляты Ка42 и Ка62, при анализе которых наблюдали сравнительно слабую, но отчетливую положительную реакцию (Табл. 10). Еще одна мутация в универсальном эпитопе изолята К10 - D100N - очевидно, также влияет на эффективность связывания антител 5В с гомологичным эпитопом.

Таблица 10. Взаимодействие изолятов PPV-С поликлональными антителами к PPV и моноклональными антителами 5В в DAS-ELISA и TAS-ELISA, соответственно.

Наименование изолята	Оптическая плотность при длине волны 405 нм <sup>1</sup>		Последовательность универсального эпитопа <sup>4</sup>
	DAS-ELISA <sup>2</sup>	TAS-ELISA <sup>3</sup>	
Bg6	2.42	0.20	ERDVDAG
Bg10	2.32	0.27	ERDVDAG
Bg26	2.80	0.21	ERDVDAG
Bg60	2.56	2.34	DRDVDAG
Bg66	2.69	1.09	DRDVDAG
Ка1	2.63	2.42	DRDVDAG
Ка5	2.63	1.36	DRDVDAG
Ка7	2.70	2.87	DRDVDAG
Ка10	2.57	0.78	DRDVNAG
Ка11	2.69	0.24	ERDVDAG
Ка12	2.76	1.45	DRDVDAG
Ка13	2.95	0.22	ERDVDAG
Ка15	2.23	2.35	DRDVDAG
Ка16	2.81	2.48	DRDVDAG
Ка19	2.85	0.24	ERDVDAG
Ка20	2.78	0.18	ERDVDAG
Ка21	2.68	0.24	ERDVDAG
Ка22	2.74	0.27	ERDVDAG
Ка23	3.12	2.87	DRDVDAG
Ка24	2.95	0.26	ERDVDAG
Ка27	2.78	1.74	DRDVDAG
Ка28	3.07	0.24	ERDVDAG
Ка31	2.82	2.66	DRDVDAG
Ка42	2.54	0.66	ERDVDAG
Ка43	2.71	2.20	DRDVDAG
Ка44	1.95	1.59	DRDVDAG
Ка45	2.66	2.55	DRDVDAG
Ка54	2.40	0.24	ERDVDAG

Ka55	2.54	2.18	DRDVDAG
Ka56	2.76	2.34	DRDVDAG
Ka57	2.57	0.23	ERDVDAG
Ka58	2.68	0.29	ERDVDAG
Ka62	2.65	0.69	ERDVDAG
Pav2	2.78	0.22	ERDVDAG
Pav3	2.65	1.46	DRDVDAG
Pav5	2.72	0.21	ERDVDAG
Pav67	2.63	0.23	ERDVDAG
Pav8	2.89	2.56	DRDVDAG
Pul	2.74	2.96	DRDVDAG
Безвирусная вишня <sup>5</sup>	0.21	0.24	

- 1) Средняя из двух повторностей.
- 2) ELISA reagent set 31505 (Agdia, США).
- 3) Набор K10-B (Agritest, Италия).
- 4) Аминокислотные остатки от 96 до 102 в N-конце белка оболочки.
- 5) Отрицательный контроль.

Результаты TAS-ELISA согласуются с данными Вестерн-блота с антителами 5В (Рис. 23). Интенсивное окрашивание зоны полноразмерного БО и его фрагментов наблюдали у изолятов Ka7, Pav3 и Ka5 с последовательностью универсального эпитопа <sup>96</sup>DRDVDAG<sup>102</sup>. Не обнаружено окрашивания зоны БО у изолятов Bg26 и Pav67 с мутацией D96E. Очень слабое окрашивание зоны БО наблюдали при анализе изолятов Ka10, Ka42 и Ka62. Возможно, образцы Ka42 и Ka62 заражены каждый двумя изолятами вируса, у одного из которых экспрессирован эпитоп <sup>96</sup>DRDVDAG<sup>102</sup>, а у второго - с мутацией D96E, причем изолят с мутантным эпитопом превалирует в обоих образцах. Следует отметить, что так же, как и у изолятов штаммов W, CR и CV, мол. м. полноразмерного БО PPV-C (около 41 кДа) превосходит массу, вычисленную по аминокислотному составу (36,8 кДа).

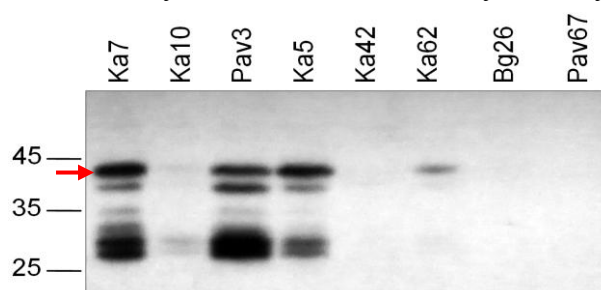
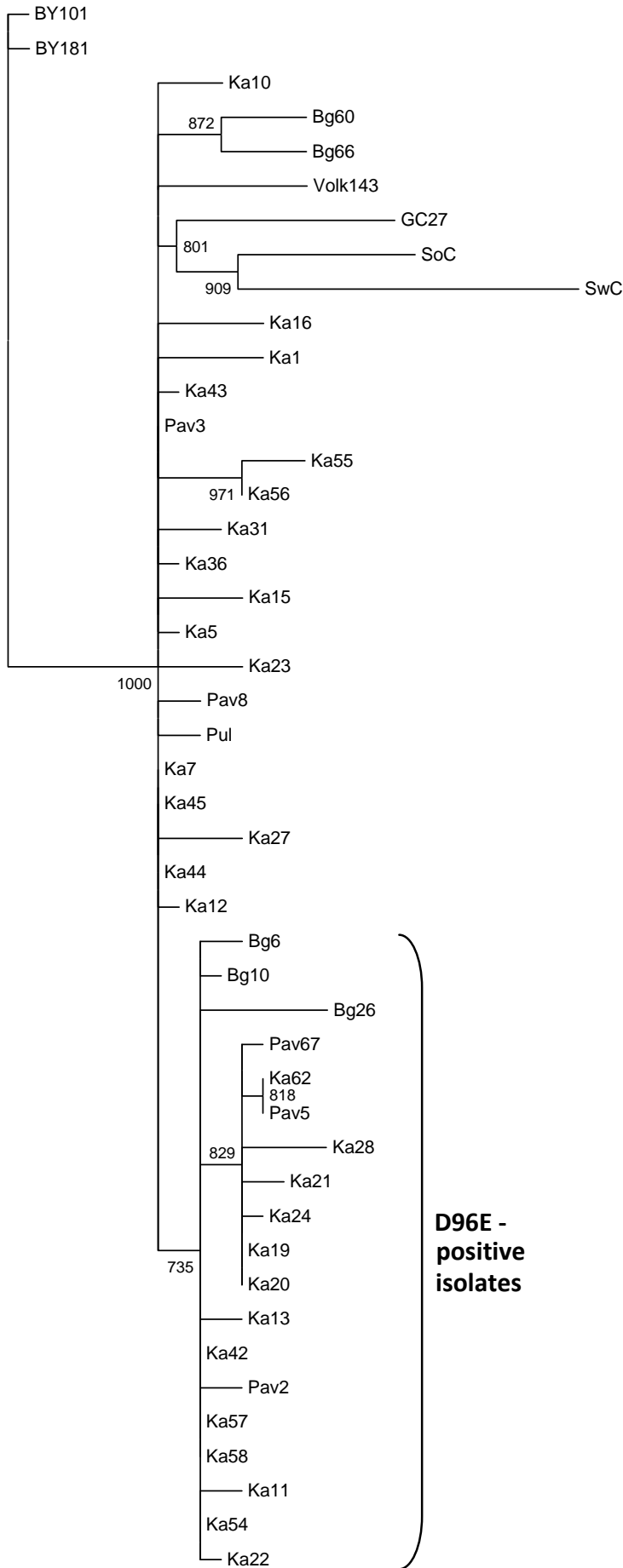


Рис. 23. Результаты анализа изолятов PPV штамма С с интактным и мутантным универсальным эпитопом белка оболочки (БО) методом Вестерн-блота с антителами 5В. Стрелки слева от рисунка показывают положение белков-маркеров молекулярной массы (кДа) (Thermo Scientific). Красная стрелка указывает положение полноразмерного БО.



0.002

Рис. 24. Филогенетический анализ гена белка оболочки (БО) изолятов PPV-C. Дерево реконструировано методом максимального правдоподобия с помощью программы MEGA7. Значения бутстрэп-анализа (>80%) указаны рядом с узлами. Масштабная черта показывает число замен на 1 нуклеотид. Номера последовательностей новых изолятов приведены в Таблице 1. Номера других последовательностей, использованных в анализе: AY184478 (SoC), Y09851 (SwC), KY221840 (GC27), HQ840517 (BY101), HQ840518 (BY181), KJ787006 (Volk143). Фигурной скобкой объединены изоляты с мутацией D96E в универсальном эпителие БО.

При филогенетическом анализе 3'-концевых последовательностей генома новых изолятов штамма С изоляты с мутацией D96E образовывали отдельный кластер (Рис. 24). Географической кластеризации российских изолятов не обнаружено.

Определены полногеномные последовательности 7 новых изолятов PPV-C из Москвы и Татарстана. Почти полные геномы изолятов Ka7, Ka15, Ka23, Bg6, Bg26, Bg66 и Pul были собраны из 1 (Ka7, Ka15), 3 - 4 (Ka23, Bg6, Bg26, Bg66) или 6 (Pul) контигов длиной 202 - 9744 нт, покрывающих до 99,5% полногеномной последовательности референсного изолята BY181 со средней глубиной покрытия от 7x (вблизи 5'-конца генома) до 154x на 3'-конце. Пробелы между контигами и 5'-концевые участки были секвенированы методом Сэнгера. Как у всех известных изолятов этого штамма, геномы новых изолятов состоят из 9795 нт. Ген БО длиной 996 нт кодирует белок из 332 аминокислотных остатков. Идентичность полных геномов новых и известных изолятов штамма С составила 98,2 - 99,4%, а полипротеинов 97,9 - 99,9%, что показывает низкий уровень внутриштаммовой изменчивости геномов PPV-C.

Филогенетический анализ полногеномных последовательностей новых изолятов показал, что они с вероятностью 100% входят в кластер изолятов штамма С (Рис. 25). Сайты протеолиза и мотивы, опосредующие перенос вируса тлями, оказались идентичны в полипротеинах новых изолятов. Пять аминокислотных замен в полипротеине Ka15 (Q36R в P1, A2799V в NIb, T2836I, D2860A, A2866T в N-конце БО) отличают изолят из войлочной вишни от изолятов из вишни обыкновенной. Неясно, можно ли рассматривать эти замены как признак адаптации PPV-C к этому хозяину, поскольку Ka15 пока единственный изолят PPV-C, найденный на войлочной вишне.

Анализ рекомбинации выявил новое междуштаммовое РС в 5'-конце всех известных полногеномных последовательностей изолятов штамма С (Рис. 26, Табл. 11). Оно поддержано большинством алгоритмов, встроенных в RDP4, со статистически значимыми *P*-values. Основным родителем является изолят Tat-4 (PPV-CV), а минорным - RU-17sc (PPV-CR). Сопоставление результатов филогении полногеномных последовательностей,



рекомбинационного анализа и данных по распространению вишневых штаммов PPV в Европейской России позволяет предположить, что наиболее распространенный (= эволюционно успешный) штамм С мог образоваться в результате рекомбинации между изолятами PPV-CR и PPV-CV. В настоящее время ареалы штаммов CR и CV не совпадают, но в прошлом эти штаммы могли соседствовать. Высокие значения *P*-values, рассчитанные для PC1 (Табл. 11), также могут оказаться следствием древности PC1. Кроме того, обнаружено внутриштаммовое рекомбинационное событие (PC2) между изолятами SoC и Volk143.

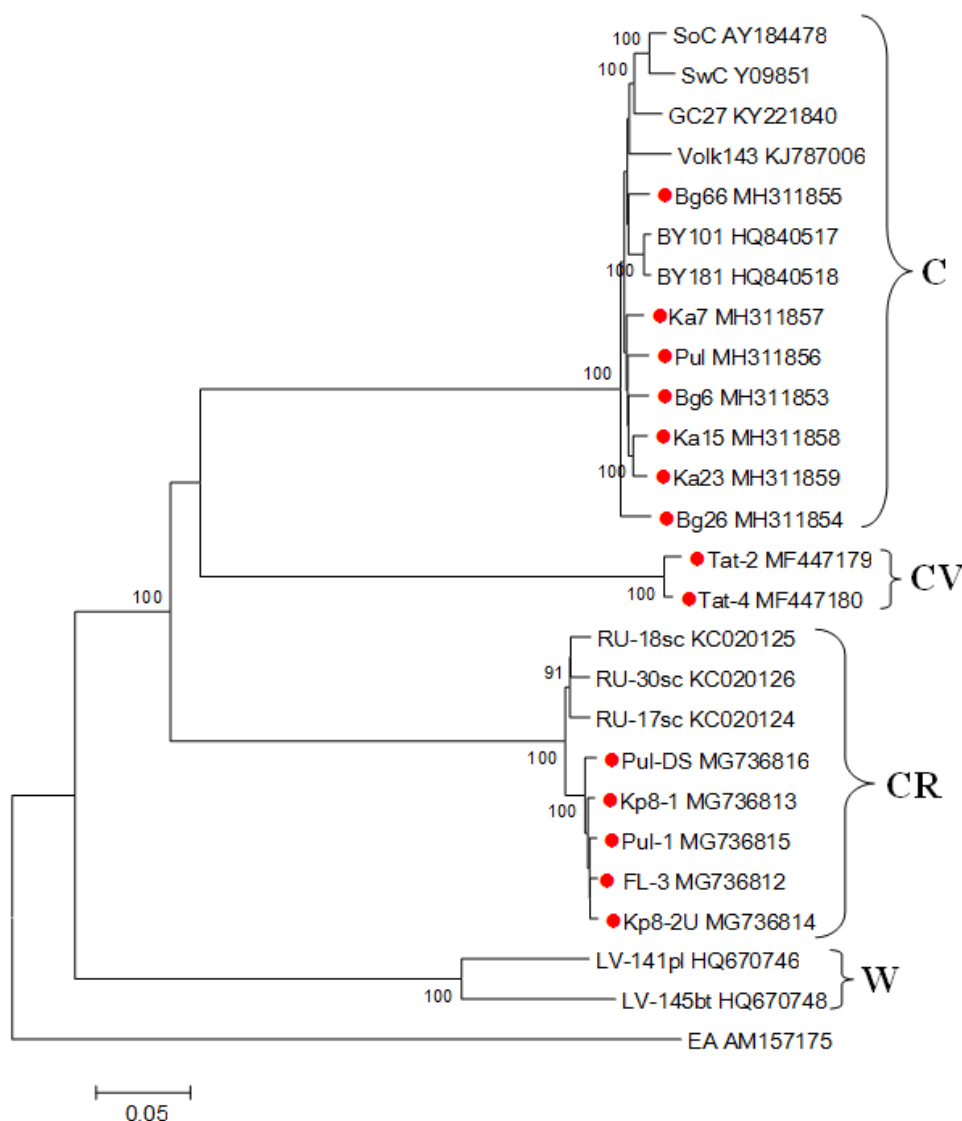


Рис. 25. Филогенетический анализ полногеномных последовательностей изолятов штамма С. Дерево реконструировано методом максимального правдоподобия с помощью программы MEGA7. Названия изолятов и номера последовательностей указаны на концах ветвей. Знаком (●) отмечены новые российские изоляты. Значения бутстрэп-анализа (>90%) указаны рядом с узлами. Фигурными скобками объединены изоляты, относящиеся к

определенному штамму. Последовательность изолята PPV-ЕА использована в качестве филогенетической аутгруппы. Масштабная черта показывает число замен на 1 нуклеотид.

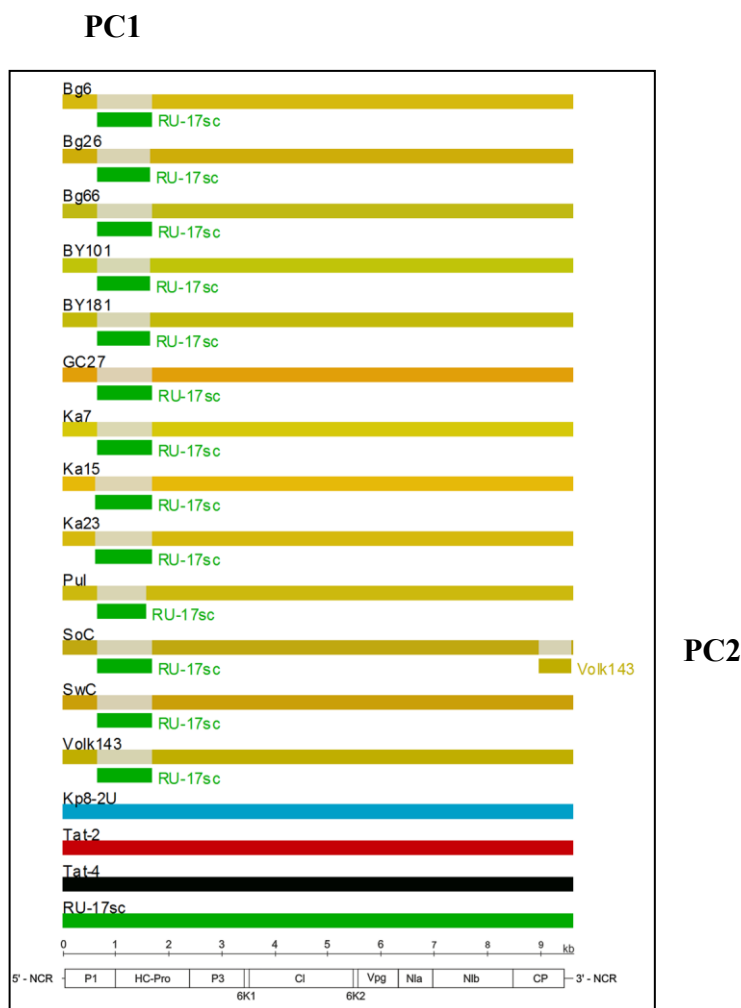


Рис. 26. Схематическое изображение рекомбинационных событий, предсказанных при анализе выравнивания полногеномных последовательностей вишневых изолятов PPV, с помощью RDP4. Выравнивали полногеномные последовательности 13 изолятов PPV-C, 2 изолятов PPV-CR (RU-17sc, Kp8-2U) и 2 изолятов PPV-CV (Tat-2, Tat-4). Названия изолятов приведены поверх длинных прямоугольников. Короткие прямоугольники под ними указывают положение рекомбинантной последовательности в рекомбинантном геноме и название предполагаемого минорного родителя. Карта генома PPV и масштабная линейка представлены внизу схемы.

Результаты рекомбинационного анализа подтвердились при филогенетическом анализе предполагаемых рекомбинантных участков генома (Рис. 27). Сравнение деревьев, представленных на рис. 26 и 27, демонстрирует их неконгруэнтность. Так, при филогении полногеномных последовательностей изоляты штамма С оказываются в одном кластере с изолятами штамма CV, в то время как при анализе рекомбинантных участков генома (рис. 27) группа PPV-С располагается ближе всего к изолятам штамма CR.

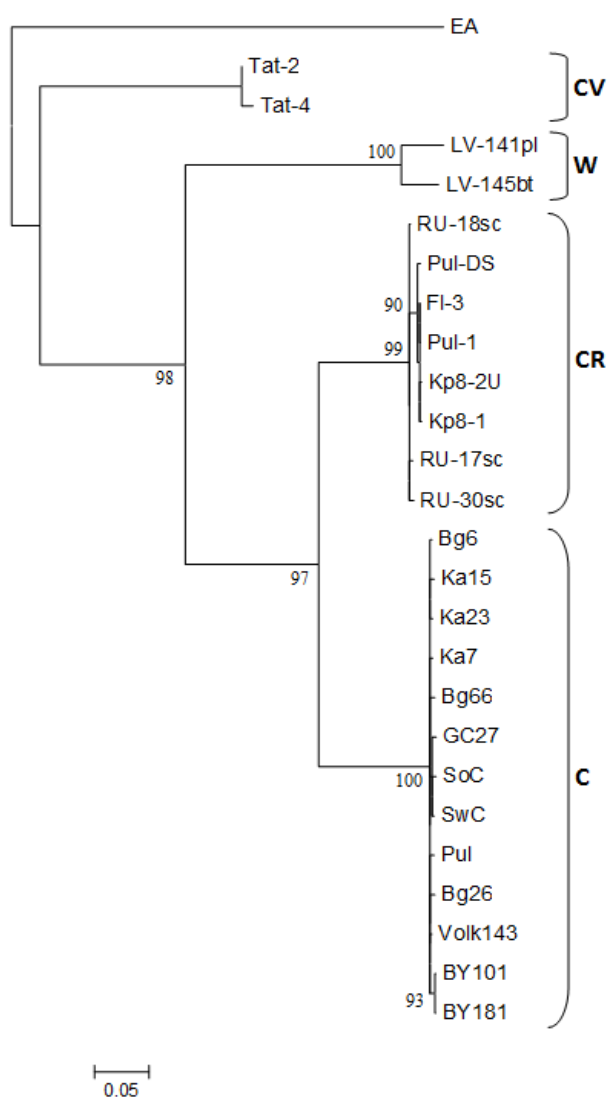


Рис. 27. Филогенетический анализ предполагаемых рекомбинантных участков генома изолятов штамма С. Дерево реконструировано методом максимального правдоподобия с помощью программы MEGA7. Названия изолятов указаны на концах ветвей. Значения бутстрэп-анализа (>90%) указаны рядом с узлами. Фигурными скобками объединены изоляты, относящиеся к определенному штамму. Последовательность изолята PPV-EA использована в качестве филогенетической аутгруппы. Масштабная черта показывает число замен на 1 нуклеотид.

Изучена возможность распространения PPV-C семенами плодов с растения вишни, зараженной изолятом Bg66. 138 семян были проверены на наличие вируса через 6 месяцев после высаживания проросших семян в горшки. Ни в одном случае не были обнаружены ни типичные симптомы инфекции, ни положительные реакции в DAS-ELISA или специфические продукты ПЦР с праймерами P1/P2. Таким образом, PPV-C, видимо, не передается семенами вишни.

В то же время, изоляты Ka5, Ka7, Ka10, Ka11, Ka21, Ka55 и Ka56 обнаружены на деревьях вишни, выращенных из семян. Изолят Pul найден на дикорастущем дереве. Это указывало на возможность переноса вируса на каждое из этих деревьев тлями. В трех обследованных регионах Европейской России вишня колонизируется черной вишневой тлей *M. cerasi*. Перенос особей *M. cerasi* с листьев и побегов, зараженных изолятами Pul, Ka13, Ka16 и Ka23, на здоровые сеянцы вишни и на растения *N. benthamiana* не привел к переносу инфекции спустя 5 недель (для растений табака) или 12 месяцев (для растений вишни) после инокуляции, как установлено с помощью ИФА, ОТ-ПЦР и при визуальном анализе инокулированных растений. По всей вероятности, тля *M. cerasi* не является переносчиком изолятов штамма С.

#### **4.4.4. Отличительные особенности вишневых изолятов.**

В данной работе на вишне обыкновенной (*P. cerasus*) были открыты два новых штамма PPV: CR и CV. Таким образом, впервые показано, что вишня может заражаться несколькими штаммами вируса. Открытие новых штаммов, адаптированных к вишне, позволяет провести их сравнительный анализ для выяснения особенностей, присущих вишневым изолятам и выявления возможных вирусспецифических детерминант, определяющих возможность системной инфекции PPV в вишне.

Геномы вишневых изолятов состоят из 9795 (штамм С) или 9792 (CR, CV) нт, в то время как у других штаммов PPV длина генома составляет 9786 или 9789 нт (у некоторых изолятов PPV-W). Различия в длине геномов обусловлены наличием двух дополнительных триплетов (позиции от 28 до 33 нт) в гене БО всех известных вишневых изолятов. Таким образом, БО вишневых изолятов длиннее БО изолятов других штаммов вируса на 1 - 2 аминокислотных остатка.

Таблица 11. Рекомбинационные события, предсказанные в полногеномных последовательностях изолятов PPV-C с помощью Recombination Detection Program v.4.69 (RDP4).

Номер РС*	Рекомбинант	Позиции брейкпойнтов		Основной родитель	Минорный родитель	<i>P</i> values, вычисленные 6 различными методами, встроенными в RDP4					
		Начало РС	Конец РС			RDP	Geneconv	Bootscan	Maxchi	Chimaera	SiScan
1	Bg6	664	1723	Tat-4	RU-17sc	$3.6 \times 10^{-07}$	Не определяется	$7.5 \times 10^{-05}$	$2.7 \times 10^{-04}$	$8.1 \times 10^{-04}$	$1.3 \times 10^{-22}$
	Bg26	664	1703								
	Bg66	664	1723								
	BY101	664	1703								
	BY181	664	1703								
	GC27	649	1723								
	Ka7	664	1723								
	Ka15	625	1723								
	Ka23	625	1723								
	Pu1	649	1653								
	SoC	664	1723								
	SwC	664	1723								
	Volk143	664	1723								
2	SoC	9096	9756	SwC	Volk143	$2.0 \times 10^{-03}$	$7.9 \times 10^{-03}$	$8.1 \times 10^{-03}$	$1.2 \times 10^{-03}$	$9.1 \times 10^{-04}$	$7.4 \times 10^{-03}$

\*) РС - рекомбинационное событие

При выравнивании полипротеинов вишневых (С, CR) и других штаммов PPV были выявлены аминокислотные позиции, специфичные для вишневых изолятов (Glasa et al., 2013). Более широкое сравнение с включением полипротеинов новых изолятов штаммов С, CR и CV, охарактеризованных в нашей работе, и других последовательностей PPV, депонированных в GenBank после 2013 года, позволил существенно уточнить эти данные (Табл. 12).

Таблица 12. Аминокислотные остатки, специфичные для полипротеинов штаммов С, CR и CV.

Вирусный белок	Количество специфических/всех аминокислотных остатков	Позиции специфических аминокислотных остатков в полипротеине вишневых изолятов <sup>1)</sup>
P1	18/308	V <sup>25</sup> , A <sup>30</sup> , I <sup>37</sup> , W <sup>117</sup> , E <sup>123</sup> , H <sup>127</sup> , T <sup>137</sup> , D <sup>143</sup> , P <sup>145</sup> , R <sup>147</sup> , K <sup>151</sup> , D <sup>162</sup> , N <sup>180</sup> , T <sup>194</sup> , H <sup>196</sup> , R <sup>203</sup> , Q <sup>206</sup> , R <sup>266</sup>
HCPro	3/458	R <sup>466</sup> , E <sup>640</sup> , M <sup>762</sup>
P3	6/350	I <sup>888</sup> , N <sup>914</sup> , A <sup>1000</sup> , A <sup>1022</sup> , Y <sup>1081</sup> , M <sup>1082</sup>
CI	3/635	M <sup>1227</sup> , Y <sup>1415</sup> , Q <sup>1779</sup>
6K2	1/53	A <sup>1854</sup>
VPg	9/193	G <sup>1949</sup> , I <sup>1957</sup> , E <sup>1961</sup> , P <sup>1970</sup> , A <sup>1975</sup> , L <sup>1979</sup> , V <sup>1984</sup> , A <sup>2038</sup> , S <sup>2043</sup> ,
NIa	1/243	N <sup>2211</sup>
(Nter)CP <sup>2)</sup>	14/102	G <sup>2814</sup> , L <sup>2821</sup> , S <sup>2827</sup> , T <sup>2835</sup> , P <sup>2836</sup> , S <sup>2840</sup> , P <sup>2845</sup> , P <sup>2846</sup> , S <sup>2880</sup> , Y <sup>2884</sup> , Q <sup>2890</sup> , N <sup>2891</sup> , R <sup>2904</sup> , K <sup>2905</sup>
(Cter)CP <sup>3)</sup>	2/230	S <sup>2918</sup> , S <sup>2979</sup>

1) Нумерация по полипротеину изолята RU-30sc (KC020126), штамм CR.

2) N-концевой участок белка оболочки (аминокислоты 1 - 102).

3) Центральный и C-концевой участок белка оболочки.

Заливкой выделены остатки с высокой вероятностью положительного отбора.

Эти результаты показывают, что специфичные для вишневых штаммов аминокислотные остатки встречаются во всех вирусных белках, за исключением 6K1 и NIb, что соответствует приведенным в Обзоре литературы данным о вовлеченности нескольких белков потивирусов в определение круга хозяев. В то же время совершенно очевидно, что наибольшее количество аминокислотных остатков, дискриминирующих вишневые изоляты от других штаммов вируса, сосредоточено в белках P1, VPg и N-конце БО. Аналогичные результаты получены при сравнении реконструированного полипротеина предполагаемого предшественника вишневых штаммов, не способного заражать вишню, и полипротеинов штаммов С и CR (Sanderson et al., 2017). Можно предположить, что аминокислотные замены

именно в этих белках оказались наиболее значимы для адаптации PPV к вишне. У изолятов штаммов С и CR в белках P1 и VPg было выявлено по четыре аминокислотных остатка с высокой вероятностью положительного отбора (Sanderson et al., 2017). Семь из них выделены зеленой заливкой в Табл. 12. Наличие восьмого (гистидина в позиции 158) не подтвердилось при анализе новых вишневых изолятов. Следует отметить, что важное значение P<sup>1970</sup> и замен в позициях 138 и 139 (по соседству с T<sup>137</sup>) для хозяйской специфичности была продемонстрирована в экспериментах с химерными геномами PPV (Wallis et al., 2007; Salvador et al., 2008; Carbonell et al., 2013; Calvo et al., 2014).

БО изолятов каждого из трех штаммов, адаптированных к вишне, обладает аномально низкой электрофоретической подвижностью, не соответствующей его молекулярной массе, определенной по аминокислотному составу. Завышенная на несколько килодалтон молекулярная масса, определенная электрофоретически, может быть следствием гликозилирования остатков серина и треонина в N-конце БО. Следует отметить, что в этом отношении вишневые изоляты близки изолятам штамма W, БО которых содержит в N-конце такое же или большее количество потенциальных сайтов гликозилирования (остатков серина и треонина) и также обладает аномально низкой электрофоретической подвижностью. Определение степени гликозилирования БО вишневых изолятов, возможно, могло бы прояснить роль гликозилирования БО в способности PPV системно заражать вишню.

Особенностью вишневых изолятов является широкое распространение мутации D96E в универсальном эпитопе БО штаммов С и CR. Очевидно, что эта мутация не является фактором адаптации PPV к вишне, поскольку обнаружена не у всех изолятов штаммов С и CR и не выявлена у штамма CV. Однако мутация D96E препятствует распознаванию вируса антителами 5B, специфичными к универсальному эпитопу БО, и, таким образом, может существенно осложнять иммунохимическую диагностику PPV в образцах вишни и черешни.

Многие вишневые изоляты обнаружены на дикорастущих, т.е. непривитых, деревьях и на деревьях, выращенных из семян. Поскольку PPV, очевидно, не передается семенами вишни, можно предположить, что вирус на эти деревья был перенесен тлями. У всех исследованных нами вишневых изолятов в N-конце БО присутствует мотив DAG, а у каждого из 14 изолятов, у которых были определены полногеномные последовательности, в белке NSPro предсказано наличие мотивов KITS и PTK. Таким образом, все эти изоляты потенциально способны передаваться тлями. В лабораторных условиях PPV-С и PPV-CR переносили с одного травянистого растения на другое с помощью тлей *A. fabae* (Crescenzi et al., 1997) и *M. persicae* (Glasa et al., 2013). Однако единственным видом тли, обнаруженным нами в насаждениях вишни, оказалась черная вишневая тля *M. cerasi*, которая, согласно литературным (Labonne et al., 1995) и нашим экспериментальным данным, не является

переносчиком PPV. Таким образом, природный переносчик изолятов PPV, адаптированных к вишне, остается неизвестным.

Штаммы CR и CV обнаружены пока только в России. Широкое распространение PPV-C в Европейской России, показанное в данной работе и в работах наших коллег (Приходько и соавт., 2011, 2019; Glasa et al., 2014), отчетливо контрастирует со спорадическими находками изолятов этого штамма за ее пределами. Таким образом, имеющиеся на сегодняшний день данные указывают на возникновение вишневых штаммов вируса в России. Их редкость в зарубежной Европе может объясняться отсутствием экспорта посадочного материала вишни и черешни из России в европейские страны.



## 5. Заключение.

В данной работе обнаружено и охарактеризовано 166 новых российских изолятов PPV. Они были найдены в г. Москве, Ленинградской, Тверской, Московской, Владимирской, Тамбовской, Липецкой, Белгородской областях, Ставропольском крае, Республике Крым, Республике Дагестан, Республике Татарстан в сортовых и ботанических коллекциях, на сортоиспытательных участках, в плодоносящих и заброшенных садах, на дачных участках и дикорастущих деревьях на сливе, вишне, алыче, персике, нектарине, абрикосе, терне, войлочной вишне и сливе канадской. Еще 373 изолята этого вируса обнаружены за последнее десятилетие сотрудниками ВНИИКР при систематических обследованиях насаждений косточковых культур (Приходько и соавт., 2019). Эти результаты показывают, что PPV широко распространен в Европейской России на основных косточковых культурах.

Изучена структура природной популяции вируса. Она представлена штаммами D, M, Res, превалирующими в зарубежной Европе, и штаммами W, C, CR и CV, которые практически не встречаются за пределами бывшего СССР (W, C) или обнаружены только в России (CR, CV). Напротив, в России штаммы C и W являются одними из самых распространенных. При филогенетическом анализе полногеномных последовательностей изоляты штаммов W, C, CR и CV формировали отдельный кластер, четко обособленный от других штаммов вируса. Сопоставление результатов филогенетического анализа штаммов PPV и данных по их географическому распространению показывает, что штаммы W, C, CR и CV, по-видимому, являются автохтонными, т.е. эта эволюционная ветвь возникла и получила развитие в основном на территории современной России и/или странах бывшего СССР. Предположения о восточно-европейском или российском происхождении штамма W высказывались в литературе (James et al., 2003; Croft et al., 2008; Glasa et al., 2011). В то же время нельзя исключить возможность проникновения общего предка этих четырех штаммов в Россию из Средней или Передней Азии, являющихся центрами происхождения культурных сортов абрикоса, черешни и вишни (Janick, 2011). В настоящее время распространенность PPV в этом регионе (за исключением западной части Турции) практически не изучена.

Хотя симптомы шарки наблюдали в России с 60-х годов прошлого столетия, долгое время возможные случаи инфекции оставались не подтвержденными лабораторными методами анализа, а геномы выявленных изолятов - не изученными (Чирков и Приходько, 2015). Отличительной особенностью нашей работы явилось то, что у большинства изолятов были определены достаточно длинные (>1 тыс. нт) последовательности филогенетически наиболее информативных 3'-концевых участков генома и 31 полногеномная

последовательность, что впервые позволило провести полноценный генетический анализ российских изолятов вируса.

В результате такого анализа открыты два новых штамма вируса - CR и CV. Впервые были предсказаны внутриштаммовая рекомбинация среди изолятов штаммов W, C и M, а также новые междуштаммовые рекомбинационные события в 5'-концевом участке генома изолятов штаммов C и Rec. Таким образом, результаты нашего исследования существенно расширили представления о генетическом разнообразии этого вируса и его эволюции.

Изучены некоторые биологические свойства новых изолятов. Впервые обнаружена мутация D96E в универсальном эпитопе БО изолятов штаммов C и CR и установлено ее широкое распространение среди изолятов этих штаммов. Показано, что изоляты с такой мутацией не распознаются в TAS-ELISA с моноклональными антителами 5B, что может приводить к ложноотрицательным результатам при иммунохимической диагностике PPV в образцах вишни и черешни. Анализ природных мутаций в N-конце БО позволил уточнить последовательности эпитопов, специфичных для штаммов D и M. Тестирование ряда препаратов моноклональных антител на широкой панели новых российских изолятов штамма W показало, что PPV-W-специфичным эпитопом, по-видимому, является последовательность <sup>46</sup>MFNPV<sup>50</sup>, распознаваемая антителами 4A11. На новых природных хозяевах выявлены изоляты штаммов D, C и W - на войлочной вишне (*Prunus tomentosa*) и штамма W - на сливе канадской (*Prunus nigra*). Впервые изучена возможность переноса PPV через семена вишни и установлено, что через семена вишни, как и через семена других косточковых культур, PPV, по всей видимости, не передается.

Важным результатом работы явилось создание коллекции российских изолятов PPV из многих регионов Европейской России, насчитывающей свыше двухсот образцов всех найденных в России штаммов вируса. Депонировано в GenBank 146 полных и частичных последовательностей генома новых изолятов. Эти результаты создают серьезный задел для дальнейшего изучения PPV в России.

Результаты работы могут иметь практическое значение для борьбы с шаркой в России. В силу высокой вредоносности этого вируса в ряде стран неоднократно предпринимались попытки искоренения инфекции. Самым показательным примером является ликвидация очага шарки в штате Пенсильвания, США, возникшего, как полагают, в результате непреднамеренной интродукции одного - двух изолятов PPV из Европы. Для искоренения вируса на сравнительно небольшой территории нескольких округов этого штата потребовалось 10 лет работы (1999 – 2009). Лабораторными методами было проанализировано почти 2 млн. образцов, собранных с плодоносящих и дикорастущих деревьев косточковых культур, уничтожено свыше 2,5 тыс. зараженных и находившихся

рядом деревьев. Только прямые затраты составили \$59 млн. (Welliver et al., 2014). Этот результат показал, что работа по ликвидации отдельных очагов шарки, возникших в результате недавней интродукции вируса, может оказаться успешной, но занимает несколько лет и требует серьезных финансовых затрат. При более широком распространении вируса искоренение оказывается проблематичным. Например, через несколько лет после сообщений об искоренении шарки в Швейцарии и Великобритании PPV был обнаружен снова в других насаждениях в этих странах (Ramel et al., 2006; Mumford, 2006). Основная трудность заключается в неэффективности контроля за миграцией вирофорных тлей с помощью инсектицидов при неперсистентном способе передачи вируса. Поэтому в странах, эндемичных по шарке, искоренение вируса считается нереалистичным. На сегодняшний день более продуктивным подходом является разработка и применение фитосанитарных мер по ограничению инфекции, а в перспективе – создание устойчивых к шарке сортов косточковых культур.

Повсеместное распространение PPV и большое разнообразие вирусных изолятов свидетельствуют об эндемичности шарки в Европейской России. Основными источниками вируса являются плодопитомники, в которых размножают районированные сорта косточковых культур для сельскохозяйственных предприятий, фермерских хозяйств и садоводов-любителей (Приходько и соавт., 2008). Постоянное тестирование вируса в маточных растениях с помощью чувствительных методов лабораторной диагностики позволило бы существенно ограничить дальнейшее распространение вируса. Раскорчевка заброшенных насаждений, а также уничтожение зараженных деревьев и их поросли в производственных посадках также, несомненно, способствовало бы улучшению эпидемиологической ситуации. Еще одним источником вируса являются импортируемые саженцы. Так, изоляты PPV-M в Ставропольском крае были обнаружены только на сортах сливы, завезенных из бывшей Югославии (Приходько и соавт., 2011). Результаты нашей работы также показывают, что предковые изоляты штаммов D и Resc были, по всей вероятности, интродуцированы в Россию с зараженным материалом косточковых культур. Следует отметить, что в России PPV является карантинным объектом (Магомедов и соавт., 2013). Таким образом, усиление карантинного контроля импортируемых саженцев референтными центрами Россельхознадзора и при предотгрузочном обследовании питомников в странах – экспортерах, проводимого специалистами ВНИИКР (<https://vniikr.ru/reports/diagn>), могло бы заметно снизить риск интродукции европейских изолятов вируса.

В настоящее время, однако, наблюдается расширение ареала PPV в Европейской России. До начала XXI века вирус был идентифицирован только в Волгоградской области, Ставропольском крае и Республике Кабардино-Балкария. К 2009 году шарку зарегистрировали, кроме того, на территории Краснодарского края, Воронежской, Тамбовской, Липецкой и Ростовской областей (Кулешова и Рынза, 2010). К 2015 году вирус был обнаружен уже в 19 субъектах РФ (Чирков и Приходько, 2015). В нашей работе PPV был впервые выявлен в Ленинградской, Тверской и Владимирской областях и Республике Татарстан. Возможно, однако, что видимое расширение ареала PPV в действительности обусловлено просто расширением географии обследований насаждений косточковых культур (проведенных, в частности, в рамках данной работы), а также совершенствованием методов диагностики вируса. В этой связи стоит заметить, что распространение PPV восточнее Волги до сих пор остается практически не изученным. Можно предположить, что дальнейшие поиски вируса в неисследованных регионах будут способствовать уточнению границ его ареала и приведут к открытию новых форм PPV с неизвестными пока свойствами.

## 6. Выводы.

1) В Европейской России существует обширная природная популяция PPV, представленная штаммами D, M, Rec, преобладающими в зарубежной Европе, и штаммами W, C, CR и CV, которые практически не встречаются за пределами бывшего СССР (W, C) или обнаружены только в России (CR, CV). В Ленинградской, Тверской и Владимирской областях, Республике Татарстан и зеленых насаждениях г. Москвы PPV обнаружен впервые.

2) На вишне (*Prunus cerasus*) открыты 2 новых штамма вируса: CR (Cherry Russian) и CV (Cherry Volga).

3) Штамм W является генетически самым изменчивым штаммом PPV.

4) В различных участках генома изолятов штаммов W, C и M впервые предсказаны внутриштаммовые рекомбинационные события. В геномах изолятов штаммов C и Rec обнаружены новые междуштаммовые рекомбинационные события.

5) В универсальном эпитопе белка оболочки у изолятов штаммов C и CR широко распространена мутация D96E. Изоляты с такой мутацией не распознаются моноклональными антителами 5B, специфичными к универсальному эпитопу, что затрудняет иммунохимическую диагностику PPV в образцах вишни.

6) На новых природных хозяевах выявлены изоляты штаммов D, C и W на войлочной вишне (*Prunus tomentosa*) и штамма W на сливе канадской (*Prunus nigra*).

7) В базу данных GenBank депонированы 31 полногеномная и 115 3'-концевых последовательностей генома новых изолятов PPV штаммов D, M, Rec, W, C, CR и CV.

8) Создана коллекция российских изолятов PPV в виде лиофилизированного материала зараженных листьев сливы, вишни, персика, нектарина, абрикоса, войлочной вишни и сливы канадской, насчитывающая около двухсот образцов штаммов D, M, C, CR, CV, Rec, W из различных регионов Европейской России.

## **7. Благодарности.**

Кураторам сортовых коллекций косточковых культур:

Нине Алексеевне Соцковой (Ботанический сад МГУ имени М.В. Ломоносова), Анатолию Андреевичу Юшеву, Ольге Емельяновне Радченко, Светлане Юрьевне Орловой (Всероссийский институт растениеводства имени Н.И. Вавилова), Валентине Милендьевне Гориной (Никитский ботанический сад - Национальный научный центр РАН) - за помощь при обследовании коллекционных насаждений;

Марии Дмитриевне Логачевой (Сколковский институт науки и технологий) - за осуществление высокопроизводительного секвенирования изолятов PPV;

Владимиру Александровичу Наумову (Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова) - за содействие в биоинформационной обработке прочтений, полученных при высокопроизводительном секвенировании изолятов PPV на платформе Illumina;

Аскару Камбаровичу Ахатову (ЗАО Семко-Юниор) - за помощь при определении видов тли.

## 8. Список литературы.

1. Бызова Н.А., Сафенкова И.В., Чирков С.Н., Авдиенко В.Г., Гусева А.Н., Митрофанова И.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б., Атабеков И.Г. 2010. Взаимодействие вируса шарки сливы с антителами, конъюгированными с коллоидным золотом, и разработка иммунохроматографической тест-системы для детекции вируса. Биохимия 75: 1583 – 1595.
2. Вердеревская Т.Д., Маринеску В.Г. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда. Кишинев, Штиинца, 1985, 311 С.
3. Итоги Всероссийской сельскохозяйственной переписи 2016 года: в 8 т. / Федеральная служба гос. Статистики. М.: ИИЦ «Статистика России», 2018. Т. 4: Посевные площади сельскохозяйственных культур и площади многолетних насаждений и ягодных культур: кн. 1.: Площади сельскохозяйственных культур и многолетних насаждений. – 714 с.
4. Кулешова Ю.Г., Рынза Е.Т. 2010. Вирус шарки сливы на территории Российской Федерации. Защита и карантин растений, № 10: 35 – 36.
5. Магомедов У.Ш., Мазурин Е.С., Миронова М.К. 2013. Экономический ущерб от карантинных вредных организмов в России. Карантин растений. Наука и практика. № 2(4), 8- 12.
6. Определитель насекомых Европейской части СССР. В 5 томах. Под ред. Г.Я. Бей-Биенко. Т. 1. М.–Л.: Наука, 1964. 936 с.
7. Приходько Ю.Н., Чирков С.Н., Метлицкая К.В., Цубера Л.В. 2008. Распространенность вирусных болезней косточковых культур в Европейской части России. Сельскохозяй. Биол., № 1: 26-32.
8. Приходько Ю.Н., Мазурин Е.С., Живаева Т.С., Шнейдер Ю.А., Соколова Е. 2011. Изучение штаммов вируса шарки сливы. Защита и карантин растений, № 11: 29 – 32.
9. Приходько Ю.Н., Живаева Т.С., Шнейдер Ю.А., Морозова О., Мазурин Е.С. 2013. Выявление в Российской Федерации нового штамма вируса шарки слив – Cherry Russian (PPV-CR ). Карантин растений. Наука и практика. 4 (№ 2): 18-33.
10. Приходько Ю.Н., Живаева Т.С., Шнейдер Ю.А. 2019. Скрининговые методы выявления комплекса штаммов вируса шарки слив (PPV). Садоводство и виноградарство 1: 36 – 42.
11. Ребриков Д.В., Коростин Д.О., Шубина Е.С., Ильинский В.В. NGS: высокопроизводительное секвенирование. Под ред. Д.В. Ребрикова. М.:Бином. Лаборатория знаний, 2014. – 232 с.
12. Чирков С.Н., Приходько Ю.Н. Генетическое разнообразие и структура популяции вируса оспы (шарки) сливы в России. 2015. Сельскохозяй. Биол., 50: 529-539.

13. Adams A.N. 1978. The detection of plum pox virus in *Prunus* species by enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann. Appl. Biol.*, 90: 215 - 221.
14. Adams M.J., Antoniw J.F., Beaudoin F. 2005. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae*. *Mol. Plant Pathol.*, 6: 471 – 487.
15. Adams I.P., Glover R.H., Monger W.A., Mumford R., Jackeviciene E., Navalinskene M., Samuitiene M., Boonham N. 2009. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Mol. Plant Pathol.*, 10:537 – 545.
16. Atanasoff D. 1932. Plum pox. A new virus disease. *Annals of the University of Sofia, Faculty of Agriculture and Silviculture* 11: 49–69.
17. Atreya P.L., Atreya C.D., Pirone T.P. 1991. Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7887 - 7891.
18. Bankevich A., Nurk S., Antipov A., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Prjibelski A.D., et al. 2012. SPAdes: A new genome assemble algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.*, 19: 455–477.
19. Barba M., Czosnek Y., Hadidi A. 2014. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses* 6:106-136.
20. Barba M., Hadidi A., Candresse T., Cambra M. 2011. Plum pox virus. In: Hadidi A. et al. (eds). *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*. APS Press, St. Paul, pp. 185-197.
21. Bodin M., Glasa M., Verger D., Costes E., Dosba F. 2003. Distribution of the sour cherry isolate of *Plum pox virus* in infected prunus rootstocks. *J. Phytopathol.*, 151: 625-630.
22. Boeglin M., Quiot J.B., Labonne G. 2004. Risk assessment of contamination of cherry trees by Plum pox virus in France. *Acta Hortic.*, 657: 221–224.
23. Boscia D., Zeramardini H., Cambra M., Potere O., Gorriss M.T., Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V. 1997. Production and characterization of a monoclonal antibody specific to the M serotype of plum pox potyvirus. *Eur. J. Plant Pathol.*,103: 477–480.
24. Bujdoso G., Hrotko K. Cherry production. In *Cherries: Botany, Production and Uses*; Quero-Garcia, J., Iezzoni, A., Pulawska, J., Lang, G., Eds.; CABI: Boston, MA, USA, 2017; 1–13.
25. Calvo M., Martinez-Turino S., Garcia J.A. 2014. Resistance to *Plum pox virus* strain C in *Arabidopsis thaliana* and *Chenopodium foetidum* involves genome-linked viral protein and other viral determinants and might depend on compatibility with host translation factors. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 27: 1291 – 1301.
26. Cambra M., Asensio M., Gorriss M.T., Perez E., Camarasa T., Garcia J.A., Moya J.J., Lopez-Abella D., Vela C. Sanz A. 1994. Detection of plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. *Bull. OEPP/EPPO Bull.*, 24: 569 – 577.



27. Cambra M., Boscia D., Myrta A., Llacer G. 2006a. *Plum pox virus* and estimated cost associated with Sharka disease. Bull. OEPP/EPPO Bull., 36: 202 – 204.
28. Cambra M., Boscia D., Myrta A., Palkovics L., Navratil M., Barba M., Gorris M.T., Capote N. 2006b. Detection and characterization of *Plum pox virus*: serological methods. Bull. OEPP/EPPO Bull., 36: 254 – 261.
29. Cambra M., Vidal E. 2017. Sharka, a vector-borne disease caused by *Plum pox virus*: vector species, transmission mechanism, epidemiology and mitigation strategies to reduce its natural spread. Acta Hortic., 1163: 57 – 67.
30. Candresse T., Cambra M., Dallot S., Lanneau M., Asensio M., Gorris M.T., Revers F., Macquaire G., Olmos A., Boscia D., Quiot J.B., Dunez J. 1998. Comparison of monoclonal antibodies and polymerase chain reaction assays for the typing of isolates belonging to D and M serotypes of Plum pox potyvirus. Phytopathology 88: 198-203.
31. Candresse T., Cambra M. 2006. Causal agent of sharka disease: historical perspective and current status of *Plum pox virus* strain. Bull. OEPP/EPPO Bull., 36: 239 – 246.
32. Candresse T., Svanella-Dumas L., Gentit P., Caglayan K., Cevik B. 2007. First report of the presence of Plum pox virus Rec strain in Turkey. Plant Dis., 91: 331.
33. Candresse T., Saenz P., Garcia J. A., Boscia D., Navratil M., Gorris M.T., Cambra M. 2011. Analysis of the epitope structure of *Plum pox virus* coat protein. Phytopathology 101: 611 – 619.
34. Capote N., Gorris M.T., Martinez M.C., Asensio M., Olmos A., Cambra M. 2006. Interference between D and M types of Plum pox virus in Japanese plum assessed by specific monoclonal antibodies and quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. Phytopathology 96: 320 – 325.
35. Carbonell A., Maliogka V.I., de Jesus Perez J., Salvador B., San Leon D., Garcia J.A., Simon-Mateo C. 2013. Diverse amino acid changes at specific positions in the N-terminal region of the coat protein allow *Plum pox virus* to adapt to new host. Mol. Plant Microbe Interact., 26: 1211 – 1224.
36. Cervera M.T., Riechmann J.L., Martin M.T., Garcia J.A. 1993. 3'-terminal sequence of the plum pox virus PS and o6 isolates: evidence for RNA recombination within the potyvirus group. J. Gen. Virol., 74: 329- 334.
37. Chare E. R., Holmes E. C. 2006. A phylogenetic survey of recombination frequency in plant RNA viruses. Arch. Virol., 151: 933–946.
38. Chen D., Juarez S., Hartweck L., Alamillo J.M., Simon-Mateo C., Perez J.J., Fernández-Fernández M.R., Olszewski N.E., Garcia J.A. 2005. Identification of Secret Agent as the *O*-GlcNAc transferase that participates in *Plum pox virus* infection. J. Virology 79: 9381 - 9387.

39. Chung B.Y.W., Miller W.A., Atkins J.F., Firth A.E. 2008. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 5897 – 5902.
40. Clark M.F., Adams A.N. 1977. Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34: 475-483.
41. Clemente-Moreno M.J., Hernandez J.A., Diaz-Vivancos P. 2015. Sharka: how do plants respond to *Plum pox virus* infection? *J. Exp. Bot.*, 66: 25 - 35.
42. Crescenzi A., d'Aquino L., Comes S., Nuzzaci M., Piazzolla P., Boscia D., Hadidi A. 1997. Characterization of the sweet cherry isolate of plum pox potyvirus. *Plant Dis.*, 81: 711–714.
43. Croft H., Malinowski T., Krizbai L., Mikec I., Kajic V., Reed C., Varga A., James D. 2008. Use of Luminex xMAP-derived Bio-Plex bead-based suspension array for specific detection of PPV W and characterization of epitopes on the coat protein of the virus. *J. Virol. Meth.*, 153: 203-213.
44. Dallot S., Labonne G., Boeglin M., Quiot-Douine L., Candresse T., Quiot J.B. 1998. Peculiar plum pox potyvirus D-populations are epidemic in peach trees. *Acta Hortic.*, 472: 355 - 365.
45. Dallot S., Gottwald T., Labonne G., Quiot J.B. 2003. Spatial pattern analysis of sharka disease (*Plum pox virus* strain M) in peach orchards of southern France. *Phytopathology* 93: 1543 - 1552.
46. Dallot S., Glasa M., Jevremovic D., Kamenova I., Paunovic S., Labonne G. 2011. Mediterranean and central-eastern European countries host viruses of two different clades of *Plum pox virus* strain M. *Arch. Virol.*, 156:539-542.
47. Dallot S., Karychev R., Dolgikh S., Thebaud G., Jaquot E., Decroocq V. 2019. First report of *Plum pox virus* strain W in Kazakhstan on *Prunus domestica*. *Plant Dis.*, 103: 2702.
48. Dallot S., Kuzmanovska B., Brevet M., Rusevski R., Thebaud G. 2020. First report of *Plum pox virus* strain M, D, and Rec infecting *Prunus* spp. in the Republic of North Macedonia. *Plant Dis.*, 104: 296.
49. Damsteegt V.D., Waterworth H.E., Mink G.I., Howell W.E. 1997. *Prunus tomentosa* as a diagnostic host for detection of *Plum pox virus* and other *Prunus* viruses. *Plant Dis.*, 81: 329–332.
50. Dosba F., Maison P., Lansac M., Massonie G. 1987. Experimental transmission of Plum pox virus (PPV) to *Prunus Mahaleb* and *Prunus avium*. *J. Phytopathol.*, 120: 199-204.
51. El Maghraby I., Matić S., Fahmy H., Myrta A. 2007. Viruses and viroids of stone fruits in Egypt. *J. Plant Pathol.*, 89: 427-430.
52. EPPO. 2004. Diagnostic protocol for regulated pests. *Plum pox virus*. *Bull. OEPP/EPPO Bull.*, 34: 247-256.

53. EPPO. 2012. International standards for phytosanitary measures. ISPM 27 Diagnostic protocols. DP2: *Plum pox virus*.
54. Fanigliulo A., Comes S., Maiss E., Piazzolla P., Crescenzi A. 2003. The complete nucleotide sequence of Plum pox virus isolates from sweet (PPV-SwC) and sour (PPV-SoC) cherry and their taxonomic relationships within the species. *Arch. Virol.*, 148: 2137–2153.
55. Fernández-Fernández M.R., Camafeita E., Bonay P., Mendez E., Albar J.P., Garcia J.A. 2002. The capsid protein of a plant single-stranded RNA virus is modified by *O*-linked N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.*, 277: 135 - 140.
56. Gadiou S., Safarova D., Navratil M. 2008. Genetic variability of *Plum pox virus* isolates in the Czech Republic. *Eur. J. Plant Pathol.*, 121: 513 - 517.
57. Garcia J.A., Glasa M., Cambra M., Candresse T. 2014. *Plum pox virus* and sharka: a model potyvirus and a major disease. *Mol. Plant Pathol.*, 15: 226 – 241.
58. Gentit P. 2006. Detection of *Plum pox virus*: biological methods. *EPPO Bull.*, 36: 251 - 253.
59. Gibbs A., Mackenzie A. 1997. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *J. Virol. Meth.*, 63: 9 - 16.
60. Gildow F., Damsteegt V., Stone A., Schneider W., Luster D., Levy L. 2004. Plum pox in North America: identification of aphid vectors and a potential role for fruit in virus spread. *Phytopathology* 94: 868 - 874.
61. Glasa M., Hricovsky I., Kudela O. 1999. Evidence for non-transmission of plum pox virus by seeds in infected plum and myrobalan. *Biologia Bratislava* 54: 481–484.
62. Glasa M., Kudela O., Marie-Jeanne V., Quiot J.B. 2001. Evidence of a naturally occurring recombinant isolate of *Plum pox virus* from Slovakia. *Plant Dis.*, 85: 920.
63. Glasa M., Marie-Jeanne V., Labonne G., Subr Z., Kudela O., Quiot J.-B. 2002a. A natural population of recombinant *Plum pox virus* is viable and competitive under field conditions. *Eur. J. Plant Pathol.*, 108: 843 - 853.
64. Glasa M., Marie-Jeanne V., Moury B., Kudela O., Quiot J.-B. 2002b. Molecular variability of the P3-6K1 genomic region among geographically and biologically distinct isolates of *Plum pox virus*. *Arch. Virol.*, 147: 563 - 575.
65. Glasa M., Palkovics L., Kominek P., Labonne G., Pittnerova S., Kudela O., Candresse T., Subr Z. 2004. Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of Plum pox virus (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup. *J. Gen. Virol.*, 85: 2671 - 2681.
66. Glasa M., Paunovic S., Jeremovic D., Myrta A., Pittnerova S., Candresse T. 2005a. Analysis of recombinant *Plum pox virus* (PPV) isolates from Serbia confirms genetic homogeneity and supports a regional origin for the PPV-Rec subgroup. *Arch. Virol.*, 150: 2051 - 2060.

67. Glasa M., Candresse T. 2005b. Partial sequence analysis of an atypical Turkish isolate provides further information on the evolutionary history of *Plum pox virus* (PPV). *Virus Res.*, 108: 199-206.
68. Glasa M., Svanella L., Candresse T. 2006. The complete nucleotide sequence of *Plum pox virus* El Amar isolate. *Arch. Virol.*, 151: 1679 – 1682.
69. Glasa M., Malinowski T., Predajna L., Pupola N., Dekena D., Michalczyk L., Candresse T. 2011. Sequence variability, recombination analysis and specific detection of the W strain of *Plum pox virus*. *Phytopathology* 101: 980 – 985.
70. Glasa M., Prichodko Y., Predajna L., Nagyova A., Shneider Y., Zhivaeva T., Subr Z., Cambra M., Candresse T. 2013. Characterization of sour cherry isolates of plum pox virus from the Volga Basin in Russia reveals a new cherry strain of the virus. *Phytopathology* 103: 972 - 979.
71. Glasa M., Shneyder Y., Predajna L., Zhivaeva T., Prikhodko Y. 2014. Characterization of Russian Plum pox virus isolates provides further evidence of a low molecular heterogeneity within the PPV-C strain. *J. Plant Pathol.*, 96: 597 – 601.
72. Gottwald T.R., Avinent L., Llacer G., Hermoso de Mendoza A., Cambra M. 1995. Analysis of the spatial spread of sharka (*Plum pox virus*) in apricot and peach orchards in Eastern Spain. *Plant Dis.*, 79: 266-278.
73. Gurcan K., Ceylan A. 2016. Strain identification and sequence variability of *Plum pox virus* in Turkey. *Turk. J. Agric. Forestry* 40: 746-760.
74. Gurcan K., Teber S., Caglayan K. 2019. Further investigation of a genetically divergent group of plum pox virus-M strain in Turkey. *J. Plant Pathol.*, 101:385 - 391.
75. Gurcan K., Teber S., Candresse T. 2020. Genetic analysis suggests a long and largely isolated evolutionary history of plum pox virus strain D in Turkey. *Plant Pathol.*, 69: 370 - 378.
76. Hajizadeh M., Gibbs A.J., Amirnia F., Glasa M. 2019. The global phylogeny of *Plum pox virus* is emerging. *J. Gen. Virol.*, 100: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001308>.
77. Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41: 95–98.
78. Herves M., Ciordia S., Navajas R., Garcia J.A., Martinez-Turino S. 2020. Common and strain-specific post-translational modifications of the potyvirus *Plum pox virus* coat protein in different hosts. *Viruses* 12:308.
79. Hipper C., Brault V., Ziegler-Graft V., Revers F., 2013. Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. *Frontiers in Plant Sci.*, 4: 154.
80. Isac M., Preda S., Marcu M. 1998. Aphid species - vectors of *Plum pox virus*. *Acta Virologica* 42: 233 - 234.

81. Ivanov K.I., Eskelin K., Lohmus A., Makinen K. 2014. Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection. *J. Gen. Virol.*, 95: 1415 – 1429.
82. James D., Varga A., Thompson, D., Hayes S. 2003. Detection of a new and unusual isolate of *Plum pox virus* in plum (*Prunus domestica*). *Plant Dis.*, 87: 1119-1124.
83. James D., Varga A. 2004. Preliminary molecular characterization of *Plum pox virus* isolate W3174: evidence of a new strain. *Acta Hortic.*, 657: 177-182.
84. James D., Varga A. 2005. Nucleotide sequence analysis of *Plum pox virus* isolate W3174: evidence of a new strain. *Virus Res.*, 110:143-150.
85. James D., Thompson D. 2006. Host and symptoms of *Plum pox virus*: ornamental and wild *Prunus* species. *Bull. OEPP/EPPO Bull.*, 36: 222 – 224.
86. James D., Varga A., Sanderson D. 2013. Genetic diversity of *Plum pox virus*: strains, disease and related challenges for control. *Can. J. Plant Pathol.*, 35: 431 – 441.
87. James D. 2017. Perspective on strategies for controlling the spread of Plum pox virus, causal agent of sharka/plum pox. *Acta Hortic.*, 1163: 129 - 136.
88. Janick J. 2011. Origin and dissemination of *Prunus* crops. Peach, Cherry, Apricot, Plum, Almond. *Scripta Hortic.*, № 11: 1 - 241.
89. Jelkmann W., Sanderson D., Berwarth C., James D. 2018. First detection and complete genome characterization of a Cherry (C) strain isolate of plum pox virus from sour cherry (*Prunus cerasus*) in Germany. *J. Plant Dis. Prot.*, 125: 267–272.
90. Jiang J., Laliberte J.F. 2011. The genome-linked protein VPg of plant viruses – a protein with many partners. *Curr. Opinion Virology* 1: 347 – 354.
91. Kajic V., Cerni S., Krajacic M., Mikec I., Skoric D. 2008. Molecular typing of *Plum pox virus* isolates in Croatia. *J. Plant Pathol.*, 90: S1.9 - S1.13.
92. Kajic V, Cerni S, Škoric D. 2012. Plum pox virus on sour cherry in Croatia. In *Proceedings of the 22nd International Conference on Virus and Other Transmissible Diseases of Fruit Crops*, Rome, Italy, 3-8 June 2012.
93. Kalashyan J.A., Bilkej N.D., Verderevskaya T.D., Rubina E.V. 1994. Plum pox virus on sour cherry in Moldova. *Bull. OEPP/EPPO Bull.*, 24: 645 – 649.
94. Kalashyan Y.A., Bilkey N.D. 1989. Plum pox virus in cherries. In *Plant Virology: Conference of Czechslovak Plant Virologists*, pp. 276-306. Praha.
95. Kamenova I. 2008. *Prunus cerasifera* as a host of plum pox virus in Bulgaria *J. Plant Pathol.* 90(s1): 15 - 18.
96. Kamenova I. 2016. Non-transmission of Plum pox virus through seeds of myrobalan and apricot. *Bulg. J. Agric. Sci.*, 22: 267–271.

97. Kamenova I., Tasheva-Terzieva E., Dragoyski K., Stefanova B. 2017. Spread and competitiveness of Plum Pox Virus: Rec and -D strains in experimental plum orchard. *J. Phytopathol.*, 165: 602 – 609.
98. Kamenova I., Borisova A. 2019. Update on distribution and genetic variability of *Plum pox virus* strains in Bulgaria. *Plant Pathol. J.*, 35: 243 - 256.
99. Kaya K., Gazel M., Ulubas Serce C., Elci E., Can Cengiz F., Cambra M., Caglayan K. 2014. Potential vectors of Plum pox virus in the Eastern Mediterranean region of Turkey. *Entomologia Generalis* 35: 137 - 150.
100. Kerlan C., Dunez J. 1979. Différenciation biologique et sérologique de souches du virus de la sharka. *Ann. Phytopathol.*, 11: 241 - 250.
101. Kim Y.-C., Udeshi N.D., Balsbaugh J.L., Shabanowitz J., Hunt D.F., Olszewski N.E. 2011. *O*-GlcNAcylation of the Plum pox virus capsid protein catalyzed by SECRET AGENT: characterization of *O*-GlcNAc sites by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Amino Acids* 40: 869–876.
102. Kimura K., Usugi T., Hoshi H., Ono T., Koyano S., Kagiwada S., Nishio T., Tsuda S. 2016. Surveys of viruliferous alate aphid of *Plum pox virus* in *Prunus mume* orchards in Japan. *Plant Dis.*, 100: 40 - 48.
103. Kollerova E., Novakova S., Subr Z., Glasa M. 2006. *Plum pox virus* mixed infection detected on apricot in Pakistan. *Plant Dis.*, 90: 1108.
104. Krczal H., Kunze L. 1976. Experiments on the transmissibility of sharka virus by aphids. *Acta Hortic.*, 67: 165 - 170.
105. Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 33: 1870–1874.
106. Labonne G., Dallot S. 2006. Epidemiology of sharka disease in France. *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 36: 267 – 270.
107. Labonne G., Yvon M., Quiot J.B., Avinent L., Llacer G. 1995. Aphids as potential vectors of plum pox virus: comparison of methods of testing and epidemiological consequences. *Acta Hortic.*, 386: 207 - 218.
108. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
109. Laín S., Riechmann J.L., Méndez E., García J.A. 1988. Nucleotide sequence of the 3' terminal region of plum pox potyvirus RNA. *Virus Res.*, 10: 325 – 341.
110. Lambert C., Braxton C., Charlebois R.L., Deyati A., Duncan P., La Neve F., Malicki H.D., Ribrioux S., Rozelle D.K., Michaels B., Sun W., Yang Z., Khan A.S. 2018. Consideration for

- optimization of high-throughput sequencing bioinformatics pipelines for virus detection. *Viruses* 10: 528.
111. Levy L., Hadidi A. A. 1994. Simple and rapid method for processing tissue infected with Plum pox potyvirus for use with specific 3' non-coding region RT-PCR assays. *Bull. OEPP/EPPO Bull.*, 24: 595-604.
  112. Llacer G. 2006. Host and symptoms of *Plum pox virus*: herbaceous hosts. *Bull. OEPP/EPPO Bull.*, 36: 227 – 228.
  113. Llacer G., Cambra M. 2006. Host and symptoms of *Plum pox virus*: fruiting *Prunus* species. *Bull. OEPP/EPPO Bull.*, 36: 219 – 221.
  114. Lobato I.M., O'Sullivan C.K. 2018. Recombinase polymerase amplification: basic, application and recent advances. *Trends Analyt. Chem.*, 98: 19 – 35.
  115. Lopez-Moya J.J., Canto T., Lopez-Abella D., Diaz-Ruiz J.R. 1994. Differentiation of Mediterranean plum pox virus isolates by coat protein analysis. *Plant Pathol.*, 43: 164 – 171.
  116. Maejima K., Himeno M., Komatsu K., Takinami Y., Hashimoto M., Takahashi S., Yamaji Y., Oshima K., Namba S. 2011. Molecular epidemiology of *Plum pox virus* in Japan. *Phytopathology* 101: 567 - 574.
  117. Maejima K., Himeno M., Netsu O., Ishikawa K., Yoshida T., Fujita N., Hashimoto M., Komatsu K., Yamaji Y., Namba S. 2014. Development of an on-site plum pox virus detection kit based on immunochromatography. *J. Gen. Plant Pathol.*, 80: 176-183.
  118. Maejima K., Hashimoto M., Hagiwara-Komodo Y., Miyazaki A., Nishikawa M., Tokuda R., Kumita K., Maruyama N., Namba S., Yamaji Y. 2020. Intra-strain biological and epidemiological characterization of plum pox virus. *Mol. Plant Pathol.*, <https://doi.org/10.1111/mpp.12908>.
  119. Maiss E., Timpe U., Brisske A., Jelkmann W., Casper R., Himmler G., Mattanovich D., Katinger H. W. D. 1989. The complete nucleotide sequence of *Plum pox virus* RNA. *J. Gen. Virol.*, 70: 513-524.
  120. Malinowski T., Sowik I., Salavei A.V., Kukharchyk N.V. 2012. Partial characterization of biological properties of PPV-C isolates found in Belarus and establishment of in vitro cultures of infected L2 and OWP-C rootstocks. In *Proceedings of the 22nd International Conference on Virus and Other Transmissible Diseases of Fruit Crops, Rome, Italy, 3-8 June 2012*.
  121. Maliogka V.I., Minafra A., Saldarelli P., Ruiz-Garcia A.B., Glasa M., Katis N., Olmos A. 2018. Recent advances on detection and characterization of fruit viruses using high-throughput sequencing technologies. *Viruses* 10: 436.

122. Manachini B., Casati P., Cinanni L., Bianco P. 2007. Role of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) and its secondary hosts in *Plum pox virus* propagation. J. Econ. Entomol., 100: 1047 – 1052.
123. Maree H.J., Fox A., Al Rwahnih M., Boonham N., Candresse N. 2018. Application of HTS for routine plant virus diagnostics: state of the art and challenges. Frontiers in Plant Sci., 9:1082.
124. Martin D.P., Murrell B., Golden M., Khoosal A., Muhire B. 2015. RDP4: detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. Virus Evol., 1: 1–5.
125. Massart S., and 27 co-authors. 2019. Virus detection by high-throughput sequencing of small RNAs: large-scale performance testing of sequence analysis strategy. Phytopathology 109: 488 – 497.
126. Massart S., Olmos A., Jijakli H., Candresse T. 2014. Current impact and future directions of high throughput sequencing in plant virus diagnostics. Virus Res., 188: 90 – 96.
127. Matic S., Rwahnih M., Myrta A. 2006. Diversity of *Plum pox virus* isolates in Bosnia and Herzegovina. Plant Pathol., 55: 11 – 17.
128. Matic S., Elmaghrabi I., Law V., Varga A., Reed C., Myrta A., James D. 2011. Serological and molecular characterization of isolates of *Plum pox virus* strain El Amar to better understand its diversity, evolution, and unique geographic distribution. J. Plant Pathol., 93: 303-310.
129. Mavrodieva V., James D., Williams K., Negi S., Varga A., Mock R., Levy L. 2013. Molecular analysis of a *Plum pox virus* W isolate in plum germplasm hand carried into the USA from the Ukraine shows a close relationship to a Latvian isolate. Plant Dis., 97: 44-52.
130. Mikec I., Kajić V., Krajačić M., Škorić D. 2008. Occurrence and distribution of *Plum pox virus* in Croatia. Acta Hort., 781: 193 - 196.
131. Milosevic T.M., Glisic I.P., Milosevic N.T., Glisic I.S. 2010. *Plum pox virus* as a stress factor in the vegetative growth, fruit growth and yield of plum (*Prunus domestica*) cv. "Cacanska Rodna". Eur. J. Plant Pathol., 126: 73-79.
132. Milusheva S., Rankova Z. 2002. Plum pox virus detection in weed species under field conditions. Acta Hort., 577: 283 - 287.
133. Milusheva S., Gercheva P., Bozhkova V., Kamenova I. 2008. Experiments on transmission of *Plum pox virus* through *Prunus* seeds. J. Plant Pathol., 90: S1.23–S1.26.
134. Mink G.I. 1993. Pollen and seed-transmitted viruses and viroids. Annu. Rev. Phytopathol., 31: 375 - 402.
135. Moreno A., Fereres A., Cambra M. 2009. Quantitative estimation of plum pox virus targets acquired and transmitted by a single *Myzus persicae*. Arch. Virol., 154: 1391 - 1399.



136. Mumford R.A., Perrin A.S., Danks C. 2001. The diagnosis of plum pox virus in the UK: from strain differentiation to on-site detection. *Acta Hortic.*, 550: 65-69.
137. Mumford R.A. 2006. Control and monitoring: control of *Plum pox virus* in the United Kingdom. *Bull. OEPP/EPPO Bull.*, 36: 315 - 318.
138. Myrta A., Potere O., Boscia D., Candresse T., Cambra M., Savino V. 1998. Production of a monoclonal antibody specific to the El Amar strain of plum pox virus. *Acta Virologica* 42: 248-250.
139. Myrta A., Potere O., Crescenzi A., Nuzzaci M., Boscia D. 2000. Properties of two monoclonal antibodies specific to the cherry strain of *Plum pox virus*. *J. Plant Pathol.*, 82: 95-101.
140. Myrta A., Varga A., James D. 2006a. The complete genome sequence of an El Amar isolate of plum pox virus (PPV) and its phylogenetic relationship to other PPV strains. *Arch. Virol.*, 151: 1189-1198.
141. Myrta A., Al Rwahnih M., Savino V. 2006b. Presence of a recombinant isolate of Plum pox virus in Apulia. *J. Plant Pathol.*, 87: 127 - 130.
142. Nemchinov L., Hadidi A. 1996. Characterization of the sour chery strain of Plum pox virus. *Phytopathology* 86: 575–580.
143. Nemchinov L., Hadidi A., Maiss E., Cambra M., Candresse T., Damsteegt V. 1996. Sour cherry strain of Plum pox potyvirus (PPV): Molecular and serological evidence for a new subgroup of PPV strains. *Phytopathology* 86: 1215–1221.
144. Nemchinov L., Hadidi A. 1998. Specific oligonucleotide primers for the direct detection of plum pox potyvirus-cherry subgroup. *J. Virol. Meth.*, 70: 231 – 234.
145. Nemchinov L., Crescenzi A., Hadidi A., Piazzolla P., Verderevskaya T. Present status of the new cherry subgroup of plum pox virus (PPV-C): 629-638. A. Hadidi, R.K. Khetarpal, H. Kogazenava. *Plant Virus Disease Control*, 1998, APS Press, St. Paul, MN.
146. Nemchinov L., Hadidi A., Kolber M., Nemeth M. 2008. Molecular evidence for the occurrence of plum pox virus - Cherry subgroup in Hungary. *Acta Hortic.*, 472: 503–510.
147. Ng J.C.K., Falk B.W. 2006. Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44: 183 - 212.
148. Oishi M., Inoue Y., Kagatsume R., Shukuya T., Kasukabe R., Oya H., Hoshino S., Ushiku S., Fujiwara Y., Motokura Y., Maeda Y. 2018. First report of *Plum pox virus* strain M in Japan. *Plant Dis.*, 102:829.
149. Olmos A., Cambra M., Dasi M.A., Candresse T., Esteban O., Gorris M.T., Asensio M. 1997. Simultaneous detection and typing of plum pox potyvirus (PPV) isolates by hemi-nested PCR and PCR-ELISA. *J. Virol. Meth.*, 68: 127-137.

150. Olmos A., Bertolini E., Gil M., Cambra M. 2005. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted *Plum pox virus* RNA target in single aphid. *J. Virol. Meth.*, 128: 151 – 155.
151. Pallas V., Sanchez-Navarro J.A., James D. 2018. Recent advances on the multiplex molecular detection of plant viruses and viroids. *Frontiers in Microbiol.*, 9: 2087.
152. Palmisano F., Boscia D., Minafra A., Myrta A., Candresse T. 2012. An atypical Albanian isolate of *Plum pox virus* could be the progenitor of the Marcus strain. *Book of Abstracts of the 22<sup>nd</sup> Int. Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops.* Rome, June 3 – 8. P. 33.
153. Palmisano F., Minafra A., Myrta A., Boscia D. 2015. First report of *Plum pox virus* strain PPV-T in Albania. *J. Plant Pathol.*, 97:403.
154. Pasquini G., Simeone A.M., Conte L., Barba M. 2000. RT-PCR evidence of the non-transmission through seed of Plum pox virus strain D and M. *J. Plant Pathol.*, 82: 221–226.
155. Pasquini G., Barba M. 2006. The question of seed transmissibility of Plum pox virus. *Bull. OEPP/EPPO Bull.*, 36: 287–292.
156. Pecman A., Kutnjak D., Gutierrez-Aguirre I., Adams I., Fox A., Boonham N., Ravnikar M. 2017. Next generation sequencing for detection and discovery of plant viruses and viroids: comparison of two approaches. *Frontiers in Microbiol.*, 8: 1998.
157. Perez J.J., Juarez S., Chen D., Scott C.L., Hartweck L.M., Olszewski N.E., Garcia J.A. 2006. Mapping of two *O*-GlcNAc modification sites in the capsid protein of the potyvirus *Plum pox virus*. *FEBS Letters* 580: 5822 - 5828.
158. Perez J.J., Udeshi N.D., Shabanowitz J., Ciordia S., Juarez S., Scott C.L., Olszewski N.E., Hunt D.F., Garcia J.A. 2013. *O*-GlcNAc modification of the coat protein of the potyvirus Plum pox virus enhances viral infection. *Virology* 442:122-131.
159. Perez-Losada M., Arenas M., Galan J.C., Bracho A., Hillung J., Garcia-Gonsales N., Gonsales-Candelas F. 2020. High-throughput sequencing (HTS) for the analysis of viral populations. *Infection, Genetics and Evolution* 80: 104208.
160. Plisson C., Drucker M., Blanc S., German-Retana S., Le Gall O., Thomas D., Bron P. 2003. Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. *J. Biol. Chem.*, 278: 23753 – 23761.
161. Polak J. 2006. Host and symptoms of *Plum pox virus*: woody species other than fruit and ornamental species of *Prunus*. *Bull. OEPP/EPPO Bull.*, 36: 225 – 226.
162. Pooggin M.M. 2018. Small RNA-omics for plant virus identification, virome reconstruction, and antiviral defence characterization. *Frontiers in Microbiol.*, 9: 2779.
163. Prichodko Y. 2006. Plum pox virus (PPV) in Russia *Bull. OEPP/EPPO Bull.*, 36:213.

164. Ramel M.E., Gugerli P., Bunter M. 2006. Control and monitoring: eradication of *Plum pox virus* in Switzerland. OEPP/EPPO Bull., 36: 312 - 314.
165. Revers F., Garcia J.A. 2015. Molecular biology of potyviruses. Adv. Virus Res., 92:101- 199.
166. Rimbaud L., Dallot S., Gottwald T., Decroocq V., Jacquot E., Soubeyrand S., Thebaud G. 2015a. Sharka epidemiology and worldwide management strategies: learning lessons to optimize disease control in perennial plants. Annu. Rev. Phytopathol., 53:17.1-17.22.
167. Rimbaud L., Dallot S., Delaunay A., Borron S., Soubeyrand S., Thebaud G., Jacquot E. 2015b. Assessing the mismatch between incubation and latent periods for vector-borne diseases: the case of sharka. Phytopathology 105: 1408 - 1416.
168. Rodamilans B., Valli A., Mingot A., San Leon D. Baulcomb D., Lopez-Moya J.J., Garcia J.A. 2015. RNA polymerase slippage as a mechanism for the production of frameshift gene products in plant viruses of the Potyviridae family. J. Virology 89: 6965 – 6967.
169. Rodamilans B., Valli A., Garcia J.A. 2019. Molecular plant-*Plum pox virus* interaction. Mol. Plant-Microbe Interact., 33: 6 – 17.
170. Roossinck M.J., Martin D.P., Roumagnac P. 2015. Plant virus metagenomics: advances in virus discovery. Phytopathology 105: 716 – 727.
171. Rott M., Xiang Y., Boyes I., Belton M., Saeed H., Kesanakurti P., Hayes S., Lawrence T., Birch C., Bhagwat B., Rast H. 2017. Application of next generation sequencing for diagnostic testing of tree fruit viruses and viroids. Plant Dis., 101:1489-1499.
172. Rubio M., Martinez-Gomez P., Marais A., Sanchez-Navarro J., Pallas V., Candresse T. 2017. Recent advances and prospects in *Prunus* virology. Ann. Appl. Biol., 171: 125 – 138.
173. Salamon P., Palkovics L. 2002. Characterization of *Plum pox virus* PPV-BT-H isolate from naturally infected blackthorn (*Prunus spinosa* L.) in Hungary. Eur. J. Plant Pathol., 108: 903 - 907.
174. Salminen M. 2003. Detecting recombination in viral sequences. In *The phylogenetic handbook: a practical approach to DNA and protein phylogeny*, pp. 348-377. Edited by M. Salemi & A. M. Vandamme. Cambridge, UK, University Press.
175. Salvador B., Garcia J.A., Simon-Mateo C. 2006. Causal agent of sharka disease: *Plum pox virus* genome and function of gene products. Bull. OEPP/EPPO Bull., 36: 229- 238.
176. Salvador B., Delgadillo M.O., Saenz P., Garcia J.A., Simon-Mateo C. 2008. Identification of *Plum pox virus* pathogenicity determinants in herbaceous and woody hosts. Mol. Plant-Microbe Interact., 21: 20 – 29.

177. Sanderson D., Fu J., James D. 2017. Identification of possible evolutionary pathways of *Plum pox virus* and predicting amino acid residues of importance to host adaptation. *Acta Hort.*, 1163: 107 – 116.
178. Schneider W.L., Sherman D.J., Stone A.L., Damsteegt V.D., Frederick R.D. 2004. Specific detection and quantification of Plum pox virus by real-time fluorescent reverse transcription-PCR. *J. Virol. Meth.*, 120: 97 – 105.
179. Schneider W.L., Damsteegt V.D., Gildow F.E., Stone A.L., Sherman D.J., Levy L.E., Mavrodieva V., Richwine N., Welliver R., Luster D.G. 2011. Molecular, ultrastructural, and biological characterization of Pennsylvania isolates of *Plum pox virus*. *Phytopathology* 101: 627 - 636.
180. Scholthof K.-B., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C., Foster G. D. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.*, 12: 938-954.
181. Scott C.L., Hartweck L.M., Perez J.J., Chen D., Garcia J.A., Olszewski N.E. 2006. SECRET AGENT, an *Arabidopsis thaliana* O-GlcNAc transferase, modifies the *Plum pox virus* capsid protein. *FEBS Letters* 580: 5829 - 5835.
182. Serce C.U., Candresse T., Svanella-Dumas L., Krizbai L., Gazela M., Caglayan K. 2009. Further characterization of a new recombinant group of *Plum pox virus* isolates, PPV-T, found in orchards in the Ankara province of Turkey. *Virus Res.*, 142: 121 – 126.
183. Shan H., Pasin F., Tzanetakis I. E., Simón-Mateo C., García J. A., Rodamilans B. 2018. Truncation of a P1 leader proteinase facilitates potyvirus replication in a non-permissive host. *Mol. Plant Pathol.*, 19: 1504–1510.
184. Shen W., Shi Y., Dai Z., Wang A. 2020. The RNA-dependent RNA polymerase N1b of potyviruses plays multifunctional, contrasting roles during viral infection. *Viruses* 12: 77.
185. Shukla D.D., Tribbick G., Mason T. J., Hewish D. R., Geysen H. M., Ward C. W. 1989. Localization of virus-specific and group-specific epitopes of plant potyviruses by systematic immunochemical analysis of overlapping peptide fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8192-8196.
186. Sihelska N., Glasa M., Subr Z.W. 2017. Host preference of the major strains of *Plum pox virus* – Opinions based on regional and world-wide sequence data. *J. Integrative Agric.*, 16: 510 – 515.
187. Simon-Buelo L., Guo H.S., Garcia J.A. 1997. Long sequences in the 5'-noncoding region of plum pox virus are not necessary for viral infectivity but contribute to viral competitiveness and pathogenesis. *Virology* 233: 157 – 162.

188. Spiegel S., Kovalenko E.M., Varga A., James D. 2004. Detection and partial molecular characterization of two *Plum pox virus* isolates from plum and wild apricot in southeast Kazakhstan. *Plant Dis.*, 88: 973-979.
189. Stobbs L.W., Van Driel I., Whybourne K., Carlson C., Tulloch M., Van Lier J. 2005. Distribution of Plum pox virus in residential sites, commercial nurseries, and native plant species in the Niagara Region, Ontario, Canada. *Plant Dis.*, 89: 822 - 827.
190. Subr Z. W., Pittnerova S., Glasa M. 2004. A simplified RT-PCR-based detection of recombinant plum pox virus isolates. *Acta Virologica* 48:173-176.
191. Subr Z., Ryslava H., Kollerova E. 2007. Electrophoretic mobility of the capsid protein of the Plum pox virus strain PPV-Rec indicates its partial phosphorylation. *Acta Virologica* 51: 135 – 138.
192. Subr Z., Glasa M. 2013. Unfolding the secrets of plum pox virus: from epidemiology to genomics. *Acta Virologica* 57: 217 – 228.
193. Sutic D., Jordovic M., Rankovic M., Festic H. 1971. Comparative studies of some sharka virus isolates. *Ann. Phytopathol.* No H.S. 185 - 194.
194. Svanella-Dumas L., Maurice I., Blin V., Quaren R., Birgaentzle C., Candresse T. 2015. First report of the presence of Plum pox virus Rec strain in France. *Plant Dis.*, 99: 421.
195. Szathmary E., Novak Nadudvari J., Szabo L., Tobias I., Balazs E., Palkovics L. 2009. Characterization of a natural *Plum pox virus* isolate bearing a truncated coat protein. *Arch. Virol.*, 154: 141 – 145.
196. Szemes M., Kalman M., Myrta A., Boscia D., Nemeth M., Kolber M., Dorgai L. 2001. Integrated RT-PCR:nested PCR diagnosis for differentiating between subgroups of plum pox virus. *J. Virol. Meth.*, 92:165–175.
197. Teber S., Gurkan K. 2017. Recombination analysis of 51 *Plum pox virus* (PPV) isolates, including 10 genomes of PPV-M Istanbul. *Acta Hortic.*, 1163: 85-92.
198. Teber S., Ceylan A., Gurkan K., Candresse T., Ulubas Serce C., Akbulut M., Kaymak S., Akbas B. 2019. Genetic diversity and molecular epidemiology of the T strain of *Plum pox virus*. *Plant Pathol.*, 68: 755 – 763.
199. Thompson D. Varga A., De Costa H., Birch C., Glasa M., James D. 2009. First report of *Plum pox virus* recombinant strain on *Prunus* spp. in Canada. *Plant Dis.*, 93:674.
200. Torrance L., Andreev I.A., Gabrenaite-Verhovskaya R., Cowan G., Makinen K., Taliensky M.E. 2006. An unusual structure at one end of potato potyvirus particles. *J. Mol. Biol.*, 357: 1-8.
201. Usenik V., Kastelec D., Stampar F., Virscek Marn M. 2015. The effect of *Plum pox virus* on chemical composition and fruit quality of plum. *J. Agric. Food Chem.*, 63: 51 – 60.

202. Van Oosten H.J. 1970. Herbaceous host plants for the sharka (plum pox) virus. *Neth. J. Plant Pathol.*, 76: 253-260.
203. Varga A., James D. 2005. Detection and identification of Plum pox virus using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing. *J. Virol. Meth.*, 123: 213 – 220.
204. Varga A., James D. 2006a. Use of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of Plum pox virus. *J. Virol. Meth.* 138: 184 – 190.
205. Varga A., James D. 2006b. Real-time RT-PCR and SYBR Green I melting curve analysis for the identification of Plum pox virus strains C, EA, and W: Effect of amplicon size, melt rate, and dye translocation. *J. Virol. Meth.*, 132: 146 – 153.
206. Vidal E., Moreno A., Bertolini E., Cambra M. 2012. Estimation of the accuracy of two diagnostic methods for the detection of *Plum pox virus* in nursery blocks by latent class model. *Plant Pathol.*, 61: 413 – 422.
207. Villamor D.E.F., Ho T., Al Rwahnih M., Martin R.R., Tzanetakis I.E. 2019. High-throughput sequencing for plant virus detection and discovery. *Phytopathology* 109: 716 – 725.
208. Viršček Marn M., Mavrič M., Urbančič-Zemljič M., Škerlavaj V. 2004. Detection of *Plum pox virus* in weeds. *Acta Hortic.*, 657: 251 - 254.
209. Vozarova Z., Kamencayová M., Glasa M., Šubr Z. 2013. Plum pox virus accumulates mutations in different genome parts during a long-term maintenance in *Prunus* host plants and passage in *Nicotiana benthamiana*. *Acta Virologica* 57: 369 – 372.
210. Wallis C.M., Stone A.L., Sherman D.J., Damsteegt V.D., Gildow F.E., Schneider W.L. 2007. Adaptation of plum pox virus to a herbaceous host (*Pisum sativum*) following serial passages. *J. Gen. Virol.*, 88: 2839–2845.
211. Wei T., Zhang C., Hong J., Xiong R., Kasschau K.D., Xhou X., Carrington J.C., Wang A. 2010. Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intracellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathogens* 6: e1000962.
212. Welliver R., Valley K., Richwine N., Clement G., Albright D. 2014. Expelling a Plant Pest Invader: The Pennsylvania Plum Pox Eradication Program, A Case Study in Regulatory Cooperation (Harrisburg, PA, USA: Pennsylvania Department of Agriculture).
213. Werner W.E., Demorest D.M., Wiktorowicz J.E. 1993. Automated Ferguson analysis of glycoproteins by capillary electrophoresis using a replaceable sieving matrix. *Electrophoresis* 14: 759 - 763.

214. Wetzel T., Candresse T., Ravelonandro M., Delbos R.P., Mazyad H., Aboul-Ata A.E., Dunez J. 1991a. Nucleotide sequence of the 3'-terminal region of the RNA of the El Amar strain of plum pox potyvirus. *J. Gen. Virol.*, 72: 1741-1746.
215. Wetzel T., Candresse T., Ravelonandro M., Dunez J. 1991b. A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *J. Virol. Meth.*, 33: 355 – 365.
216. Wetzel T., Candresse T., Macquaire G., Ravelonandro M., Dunez J. 1992. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *J. Virol. Meth.*, 39: 27 - 37.
217. Youssef S.A., Shalaby A. 2006. Plum pox virus (PPV) in Egypt. *Bull. OEPP/EPPO Bull.*, 36: 208.
218. Zagrai L., Zagrai I., Ferencz B., Gaboreanu I., Kovacs K., Petricele I., Popescu O., Pamfil D., Capote N. 2008. Serological and molecular typing of plum pox virus isolates in the north of Romania. *J. Plant Pathol.*, 90(S1): 41 - 46.
219. Zhang S., Ravelonandro M., Russel P., McOwen N., Briad P., Bohannon S., Vrient A. 2014. Rapid diagnostic detection of plum pox virus in *Prunus* plants by isothermal AmplifyRP using reverse transcription-recombinase polymerase amplification. *J. Virol. Meth.*, 207: 114 - 120.
220. Zheng L., Rodoni B.C., Gibbs M.J., Gibbs A.J. 2010. A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. *Plant Pathol.*, 59: 211 - 220.