

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 634.22:632.3:578.864

Молекулярный анализ новых крымских изолятов вируса оспы сливы

А.А. Шевелева¹, И.В. Митрофанова², В.М. Горина², С.Н. Чирков^{1,2,*}¹ Кафедра вирусологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;² Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН, Россия, 298648, г. Ялта, пгт Никита, ул. Никитский спуск, д. 52

*e-mail: s-chirkov1@yandex.ru

Проведен молекулярный анализ новых изолятов вируса оспы сливы (*Plum pox virus*, PPV), обнаруженных в генофондовых коллекциях персика, абрикоса и сливы Никитского ботанического сада – Национального научного центра РАН (НБС), а также на дикорастущих деревьях алычи на прилегающей территории. Методами иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией выявлено 19 новых изолятов PPV. Большинство принадлежало к штамму D; найдено также по одному изоляту штаммов Res и M. Секвенированы 3'-концевые последовательности генома новых изолятов, включающие ген белка оболочки (БО) и примыкающие последовательности гена *NIb* и 3'-нетранслируемого региона. При филогенетическом анализе этих последовательностей изоляты PPV-D распределялись в несколько кластеров или клад. Средний уровень дивергенции между последовательностями крымских изолятов PPV-D составил 2,0%. Сравнительно высокий уровень генетической изменчивости указывает на давнюю интродукцию предков нынешних изолятов PPV-D в НБС. Изолят H23, выявленный в коллекции абрикоса, принадлежал к штамму M. Это первое обнаружение PPV-M в Крыму. Изолят AL-Ch (штамм Res) обнаружен на дикорастущей алыче. В БО изолята K87 (штамм D) обнаружена мутация K59T, которая препятствует его распознаванию PPV-D-специфичными моноклональными антителами 4DG5. В БО AL-Ch и охарактеризованных ранее изолятов K28 и Kisl-1pl (штамм Res) обнаружены аминокислотные замены в позиции 68, которые не влияли на распознавание этих изолятов моноклональными антителами AL. По-видимому, позиция 68 находится за пределами PPV-M/Res-специфичного эпитопа. Результаты работы показывают, что, по всей вероятности, PPV проник в НБС с зараженным материалом косточковых культур в результате нескольких независимых интродукций из различных регионов мира и распространился по насаждениям тлями.

Ключевые слова: косточковые культуры, генофондовые коллекции, вирус оспы сливы, филогенетический анализ, эпитоп, моноклональные антитела

Вирус оспы сливы (*Plum pox virus*, PPV) вызывает у косточковых культур рода *Prunus* болезнь, называемую шаркой, которая приводит к значительными потерям урожая персика, абрикоса, сливы и других экономически значимых культур из-за массового опадания плодов, ухудшения их качества и непригодности к переработке. Инфекция может угнетать годовой прирост и сокращает продуктивную жизнь растения [1]. PPV относится к роду *Potyvirus* из семейства *Potyviridae*. Вирионы состоят из одной молекулы РНК положительной полярности размером 9,8 тыс. нуклеотидов (нт) и примерно 2 тыс. молекул белка оболочки (БО). Геномная РНК содержит 5'- и 3'-нетранслируемые области, вирусный белок VPg, ковалентно связанный с 5'-концом РНК, и поли-А-последовательность на 3'-конце. РНК транслируется с образованием полипротеина, который нарезается вирусными протеазами P1, HCPro и NIaPro на десять белков: P1, HCPro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa,

NIb, CP (БО) [2]. PPV заражает косточковые культуры рода *Prunus* (семейство *Rosaceae*). В природных условиях вирус передается от растения к растению различными видами тли непersistентным образом [3]. PPV отличается высоким генетическим разнообразием. На основании различий в полногеномных последовательностях и филогенетического анализа различают десять штаммов вируса: D, M, EA, C, Res, W, T, An, CR и CV. Штаммы различаются по антигенным и эпидемиологическим свойствам, кругу хозяев, географическому распространению и патогенности для различных видов и сортов косточковых культур [4].

Генофондовые коллекции косточковых культур Никитского ботанического сада – Национального научного центра РАН (НБС) (г. Ялта, Республика Крым) насчитывают сотни сортов, гибридов и гибридных форм персика, нектарина, абрикоса, сливы и алычи. В наших предыдущих работах PPV был обнаружен на ряде деревьев местных и интроду-

дуцированных сортов этих культур. Большинство вирусных изолятов принадлежало к штамму D. Один изолят, выявленный на корневой поросли алычового подвоя, принадлежал к штамму Rec [5–8]. Критически важно определить возможные пути проникновения PPV в регион, степень его распространенности в насаждениях и уровень генетической изменчивости.

Целью данной работы являлся молекулярный анализ новых изолятов PPV в насаждениях косточковых культур НБС и на дикорастущих деревьях алычи на прилегающей территории путем секвенирования филогенетически информативных 3'-концевых последовательностей вирусного генома. Кроме того, изучено влияние природных мутаций в PPV-M- и PPV-D-специфичных эпитопах на их распознавание гомологичными моноклональными антителами.

Материалы и методы

Листья с характерными симптомами шарки собирали в коллекционных насаждениях персика, абрикоса, сливы и с дикорастущих деревьев алычи. Лабораторную диагностику PPV осуществляли с помощью сэндвич-варианта иммуноферментного анализа (double antibody sandwich ELISA; DAS-ELISA) с набором Reagent set SRA 31505 (Agdia, США) и иммуноспецифической полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с универсальными праймерами P1/P2, выявляющими любые изоляты вируса [9]. Штамм изолятов определяли методом ОТ-ПЦР с набором штаммспецифичных праймеров [10–11]. 3'-концевой участок генома, включающий ген БО и при-

мыкающие последовательности гена *Nlb* и 3'-нетранслируемого региона ((Cter)*Nlb*-CP-3'-NCR), амплифицировали, используя прямые праймеры NlbF, mM5 или mD5 и обратный праймер 4CPR1 [12, 13]. Продукты ОТ-ПЦР размером 1,2–1,4 тыс. пар нуклеотидов (пн) очищали с помощью набора Cleanup Standard (Евроген, Россия) и секвенировали в обоих направлениях в фирме Евроген. Последовательности (Cter)*Nlb*-CP-3'-NCR новых изолятов были депонированы в GenBank под номерами, указанными в табл. 1. Филогенетический анализ 3'-концевых последовательностей и определение степени их идентичности проводили с помощью программы MEGA7 [14]. Ближайших родственников новых изолятов определяли путем выравнивания 3'-концевых последовательностей на базе данных GenBank (*Plum rox potyvirus* (taxid:12211)) с помощью программы BLASTn. Влияние мутаций в PPV-M- и PPV-D-специфичных эпитопах на распознавание соответствующих изолятов моноклональными антителами AL [15] и 4DG5 [16] изучали методом непрямого сэндвич-варианта иммуноферментного анализа (triple antibody sandwich ELISA, TAS-ELISA) с помощью наборов K-11B и K-12B (Agritest srl, Италия).

Результаты

В коллекционных насаждениях персика (*P. persica*), абрикоса (*P. armeniaca*), сливы (*P. domestica*) и на дикорастущей алыче (*P. cerasifera*) обнаружено 19 новых изолятов PPV (табл. 1). Впервые несколько изолятов вируса обнаружено в генофондовой коллекции абрикоса. Результаты диагностики PPV с помощью DAS-ELISA и ОТ-ПЦР

Таблица 1

Описание изолятов PPV, исследованных в данной работе

Название изолята	Растение хозяин	Тип насаждения	Сорт/Гибрид	Штамм вируса	Номер последовательности в GenBank
35ph	<i>P. persica</i>	Генофондовая коллекция	Summerglo	D	MN734789
Ph	<i>P. persica</i>	Генофондовая коллекция	Дружба Народов х Бэби Голд	D	MN734802
K81	<i>P. persica</i>	Генофондовая коллекция	Пушистый Ранний	D	MT239476
K82	<i>P. persica</i>	Генофондовая коллекция	Крымский Шедевр	D	MT239477
K84	<i>P. persica</i>	Генофондовая коллекция	Ambergold	D	MT239478
K87	<i>P. persica</i>	Генофондовая коллекция	Подарок Невесте	D	MT239479
Ki	<i>P. armeniaca</i>	Генофондовая коллекция	Киото	D	MN734796
AU	<i>P. armeniaca</i>	Генофондовая коллекция	Ананасный Украинский	D	MN734792
Co1	<i>P. domestica</i>	Генофондовая коллекция	Венгерка Крупная Сладкая	D	MN734794
AL-2	<i>P. cerasifera</i>	Дикорастущее дерево		D	MN734790
BAL	<i>P. cerasifera</i>	Дикорастущее дерево		D	MN734793
Lav	<i>P. cerasifera</i>	Дикорастущее дерево		D	MN734798
N1	<i>P. cerasifera</i>	Дикорастущее дерево		D	MN734801
Spa	<i>P. cerasifera</i>	Дикорастущее дерево		D	MN734803
Lad	<i>P. cerasifera</i>	Дикорастущее дерево		D	MN734797
MM	<i>P. cerasifera</i>	Дикорастущее дерево		D	MN734799
MN	<i>P. cerasifera</i>	Дикорастущее дерево		D	MN734800
AL-Ch	<i>P. cerasifera</i>	Дикорастущее дерево		Rec	MN734791
H23	<i>P. armeniaca</i>	Генофондовая коллекция	Херсонский 23	M	MN734795

полностью совпали. Большинство изолятов принадлежало к штамму D; выявлено также по одному изоляту штаммов Res и M. У всех изолятов ген БО длиной 990 нт кодировал белок размером 330 аминокислотных остатков. В N-конце БО обнаружен мотив DAG (Асп-Ала-Гли), опосредующий векторную передачу вируса тлями.

Выравнивание 3'-концевых последовательностей генома новых изолятов штамма D показало, что они различаются на 0,2–3,1%. При филогенетическом анализе новые изоляты распределялись в несколько кластеров или клад (рисунок).

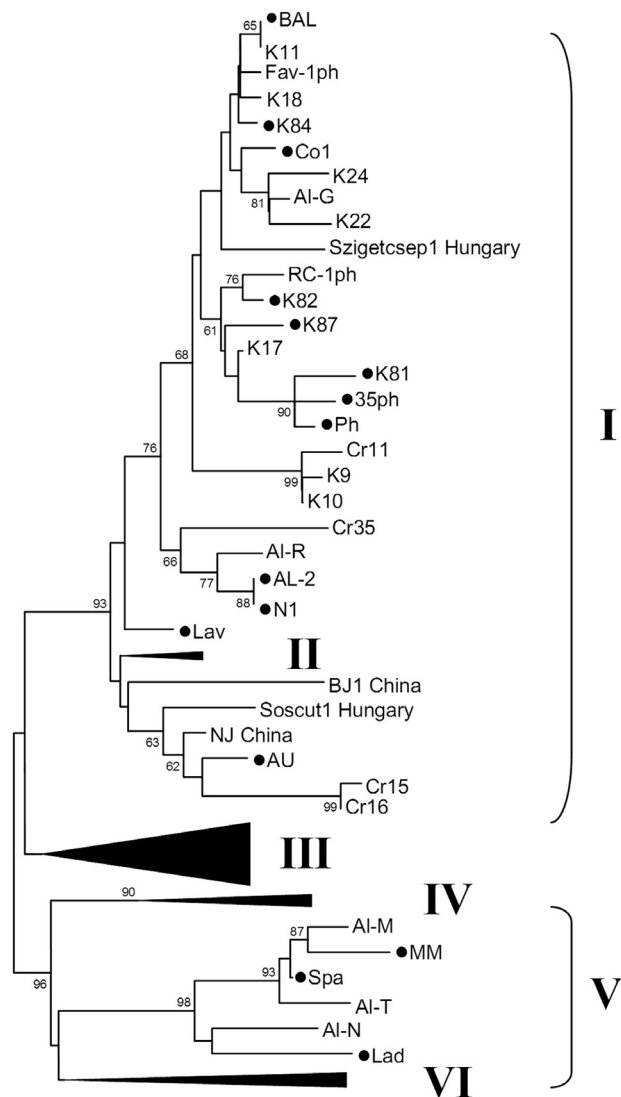


Рисунок. Филогенетический анализ 3'-концевых последовательностей изолятов PPV-D. Дерево реконструировано методом максимального правдоподобия с помощью программы MEGA7. Названия и географическая локализация изолятов не российского происхождения указаны на концах ветвей. Для российских изолятов указаны только названия. Знаком (●) отмечены изоляты, изученные в данной работе. Черными треугольниками обозначены конденсированные кластеры. Кластеры I и V выделены фигурными скобками. Кластеры II и IV состоят из турецких изолятов. Кластер III объединяет изоляты PPV-D со всего мира. Значения бутстрэп-анализа из 1000 случайных выборок (>60%) указаны рядом с узлами. Масштабная черта означает количество замен на 1 нуклеотид.

Двенадцать из 17 новых изолятов оказались в кластере I. Этот кластер с высокой бутстрэп-поддержкой (93%) объединял как новые, так и охарактеризованные ранее [6, 7] изоляты PPV-D, обнаруженные в генофондовых коллекциях персика, нектарина и сливы, а также на дикорастущих деревьях алычи с территории коллекций или находящихся в непосредственной близости от них. Четкой кластеризации изолятов по виду косточковых не выявлено. Напротив, изоляты N1, AL-2 и AL-R (KX119437) с дикорастущей алычи образуют одну кладу с Cr35 (KR028386) из нектарина; изоляты K22 (KR006730) и K24 (KP198589) со сливы группируются с Al-G (KX119433) с дикорастущей алычи; 3'-концевые участки генома изолятов K11 (KP198586) с персика и BAL с дикорастущей алычи оказались идентичны. Изолят AU с абрикоса находится в одной клade с изолятами Cr15 (KP198583) и Cr16 (KP198584), обнаруженными на нектарине. Наиболее вероятной причиной отсутствия кластеризации по виду растения-хозяина является беспрепятственное распространение вируса тлями. В кластер I входят также изоляты из Китая (BJ1, NJ), Турции (конденсированная кладу II) и Венгрии (Soscut1 и Szigetcsep1). Согласно результатам BLASTn-анализа, ближайшим зарубежным родственником большинства входящих в этот кластер изолятов является Szigetcsep1 (FN179154), идентичность с которым составила 98,83–99,45%. Ближайшим родственником изолятов K9, K22, Cr11, Cr35 и Lav является турецкий изолят EdByP1326 (MK372952) (98,71–99,45% идентичности). Следует отметить, что изолят K22 был обнаружен на сливе турецкого сорта Изюм Эрик [6, 7]. Изоляты AL-R, Al-2, N1 с дикорастущей алычи, а также AU, Cr15 и Cr16 из генофондовых коллекций абрикоса и нектарина имели ближайшим родственником (99,29–99,60% идентичности) изолят NJ (MK208990) из Китая.

Клада V с бутстрэп-поддержкой 98% представлена изолятами с дикорастущей алычи на территории НБС и в его окрестностях вне коллекционных насаждений. В нее входят как изоляты, охарактеризованные в данной работе (MM, Spa, Lad), так и изоляты, описанные ранее [7]. Эта кладу является частью кластера, образованного изолятами штамма D из Турции (конденсированная кладу IV) и с Балканского полуострова (Болгария, бывшая Югославия) (конденсированная кладу VI). Входящие в кладу V крымские изоляты имели ближайшими родственниками (98,10–98,89% идентичности) турецкий изолят KtYbP1808 (MK372973) и изолят P7R1 (LT600780) из генофондовой коллекции косточковых Казахского НИИ плодоводства и виноградарства.

Изоляты MN и Ki входят в сборный кластер III, состоящий из изолятов PPV-D со всего мира, включая Россию. Установить возможные

эволюционные связи между изолятами внутри этого кластера не удалось из-за низких значений бутстрэп-анализа. Отсутствие достоверной кластеризации частичных последовательностей типично для изолятов штамма D и обусловлено высоким сходством их геномов [17].

На абрикосе сорта Херсонский 23 был обнаружен изолят Н23. При ОТ-ПЦР с праймерами P1/PM и mM5/mM3 образовывались продукты ожидаемого размера 198 и 459 пн соответственно (данные не представлены), что указывало на принадлежность Н23 к штамму М. Анализ с помощью BLASTn показал, что ближайшим родственником Н23 является изолят GR0019 из Греции (FM955843); сходство между ними на нуклеотидном уровне составило 98,3%. Различают три филогенетических группы изолятов штамма М: Ма (западноевропейские изоляты из Франции, Италии, Греции и Кипра), Mb (центрально- и восточноевропейские изоляты из Болгарии, бывшей Югославии, Венгрии, Чехии и Словакии) и Mis (турецкие изоляты, обнаруженные в окрестностях Стамбула) [18, 19]. Изолят Н23 кластеризовался с западно-европейскими изолятами. Его принадлежность к группе Ма подтвердил и анализ нуклеотидных позиций в гене БО, дискриминирующих группы Ма и Mb. В геноме Н23 позиции 8606, 8775, 8951, 9032, 9068, 9108 и 9347 заняты нуклеотидами, характерными для группы Ма. Это первое обнаружение изолята штамма М в Крыму.

На дикорастущей алыче обнаружен изолят Al-Ch. При ОТ-ПЦР с праймерами P1/PM и mD5/mM3 образовывались продукты ожидаемого размера 198 и 605 пн соответственно (данные не представлены), что указывало на принадлежность Al-Ch к штамму Rec. Анализ с помощью BLASTn показал, что ближайшим родственником Al-Ch является изолят Pd31 из Венгрии (AJ566345); сходство 3'-концевых последовательностей генома составило 99,4%. Изолят Al-Ch оказался идентичен ранее выявленным нами изолятам Kisl-1pl из Ставропольского края и K28 из Крыма [8] на 98,9 и 99,1% соответственно.

У изолята K87 в PPV-D-специфичном эпитопе ⁵⁵QRATKP⁶⁰, локализованном в N-конце БО [6, 20], в позиции 59 остаток Лиз (К) заменен на остаток Тре (Т). Мутация K59T у изолятов PPV-D обнаружена впервые. Изолят K87 не распознавался PPV-D-специфичными моноклональными антителами 4DG5 в TAS-ELISA. Оптическая плотность в этом образце оказалась на уровне отрицательного контроля, в то время как при анализе остальных персиковых изолятов (табл. 1) с канонической последовательностью эпитопа средняя оптическая плотность составляла 2,6 ед. По-видимому, мутация K59T препятствует связыванию антител 4DG5 с гомологичным эпитопом. Следует отметить, что еще одна мутация в этой позиции – K59R – также препятствовала распознаванию изолята BOS49PI (AJ749999) антителами 4DG5 [21].

Изолят Н23 и все три российских изолята штамма Rec распознавались в TAS-ELISA с антителами AL, специфичными к штамму М. Этот результат был ожидаем, поскольку 3'-концевая последовательность PPV-Rec, включая ген БО, происходит от штамма М [22]. Предполагаемый PPV-M-специфичный эпитоп картирован внутри последовательности от 67 до 81 аминокислотного остатка N-конца БО [20]. В этой последовательности у изолятов AL-Ch, K28 и Kisl-1pl обнаружены замены (табл. 2). Методом TAS-ELISA было изучено их возможное влияние на связывание антител AL.

Остатки Про (Р) и Вал (V) в позициях 69 и 74 (оба необходимы для связывания антител AL [20]), присутствовали в БО всех четырех изолятов, что объясняет их распознавание антителами AL. Характерная для PPV-Rec замена Арг (R) на Глн (Q) в позиции 70, видимо, несущественна для связывания антител AL. Остатки Лиз (К), типичного для PPV-M в позиции 68, заменены на остатки Тре (Т) у Kisl-1pl и Al-Ch или Иле (I) у K28. Несмотря на то, что остатки К, Т и I совершенно различны, эти замены не сказывались на связывании антител AL с соответствующими изолятами. По-видимому, позиция 68 находится за пределами PPV-M-специфичного эпитопа.

Таблица 2

Влияние аминокислотных замен в PPV-M-специфичном эпитопе на его распознавание моноклональными антителами AL

Изолят	Штамм	Последовательность эпитопа	Оптическая плотность ¹	
			Поликлональные антитела ²	Моноклональные антитела AL ³
Н23	М	⁶⁷ AKPRSFQVYGNEDAS ⁸¹ *	2,07	1,71
K28	Rec	AIPQSFQVYGNEDAS	2,13	1,99
Kisl-1pl	Rec	ATPQSFQVYGNEDAS	2,96	2,43
Al-Ch	Rec	ATPQSFQVYGNEDAS	2,15	1,74

* Типичная для изолятов штамма М последовательность от 67 до 81 аминокислотного остатка (нумерация по белку оболочечки изолята Н23 (MN734795)). Аминокислотные замены выделены жирным шрифтом.

¹ Средняя (из двух повторов) при длине волны 405 нм.

² DAS-ELISA, Reagent set SRA 31505 (Agdia, США).

³ TAS-ELISA, K-11B kit (Agritest srl, Италия).

Обсуждение

Обнаружение 19 новых изолятов подтверждает широкое распространение PPV в НБС и его окрестностях. Несколько изолятов найдено на дикорастущей алыче, которая, таким образом, может являться природным резерватом вируса и служить источником его дальнейшего распространения тлями, в том числе — в генофондовых коллекциях. Уникальный генофонд косточковых культур НБС широко используется в селекции и биотехнологических исследованиях. Очевидно, что выявление зараженных деревьев путем регулярных обследований насаждений является необходимой составляющей этой работы.

Большая часть изолятов принадлежала к штамму D. Превалирование PPV-D объяснимо, поскольку этот штамм — самый распространенный в мире. В каждой стране, где обнаружили PPV и проводили типирование штаммов, изоляты PPV-D составляли значительную часть популяции этого вируса [3, 4]. Генетически PPV-D является одним из самых консервативных штаммов вируса. Средний уровень дивергенции между всеми изолятами этого штамма, депонированными в GenBank, составил 1,7% для полногеномных и 1,6% — для 3'-концевых последовательностей [23]. Средний уровень дивергенции между 3'-концевыми последовательностями крымских изолятов, входящих в кластеры I, III и V (n = 35), составил 2,0%. Дивергенция между полногеномными последовательностями крымских PPV-D (n = 5) составляла 2,5% [6]. Сравнительно высокая генетическая изменчивость крымских изолятов штам-

ма D, выявленная в данной работе и предыдущих исследованиях [6, 7], указывает на давнюю интродукцию предков нынешних изолятов PPV в НБС с зараженным посадочным материалом косточковых культур.

Обнаружено также по одному изоляту штаммов M и Rec. Оба штамма широко распространены на юго-востоке зарубежной Европы. В России PPV-M находили только на сливе и персике в Ставропольском и Краснодарском краях. Все они относились к группе Mb. Зараженные растения происходили из бывшей Югославии и, очевидно, эти изоляты завезены с посадочным материалом косточковых культур при закладке новых садов на Северном Кавказе [24]. Обнаружение изолята H23 из группы Ma указывает на возможность интродукции PPV в Россию из Западной Европы. Находка Al-Ch представляет большой интерес, поскольку изоляты штамма Rec в России встречаются очень редко.

Результаты работы показывают, что, по всей вероятности, PPV проник в НБС с зараженным материалом косточковых культур в результате нескольких независимых интродукций из различных регионов мира и распространился по насаждениям тлями.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-16-00091). Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cambra M., Boscia D., Myrta A., Llacer G. Plum pox virus and estimated cost associated with Sharka disease // Bull. OEPP/EPPO Bull. 2006. Vol. 36. N 2. P. 202–204.
2. Revers F., Garcia J.A. Molecular biology of potyviruses // Adv. Virus Res. 2015. Vol. 92. P. 101–199.
3. Rimbaud L., Dallot S., Gottwald T., Decroocq V., Jacquot E., Soubeyrand S., Thebaud G. Sharka epidemiology and worldwide management strategies: learning lessons to optimize disease control in perennial plants // Annu. Rev. Phytopathol. 2015. Vol. 53. P. 17.1–17.22.
4. Garcia J.A., Glasa M., Cambra M., Candresse T. Plum pox virus and sharka: a model potyvirus and a major disease // Mol. Plant Pathol. 2014. Vol. 15. N 3. P. 226–241.
5. Mitrofanova I., Mitrofanova O., Chirkov S., Lesnikova-Sedoshenko N., Chelombit S. Detection and identification of Plum pox virus on Prunus species in Crimea // Agriculture and Forestry. 2015. Vol. 61. N 4. P. 197–204.
6. Chirkov S., Ivanov P., Sheveleva A., Kudryavtseva A., Prikhodko Y., Mitrofanova I. Occurrence and characterization of plum pox virus strain D isolates in European Russia and Crimea // Arch. Virol. 2016. Vol. 161. N 2. P. 425–430.
7. Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Ivanov P.A., Sheveleva A.A., Chirkov S.N. Three highly divergent groups of Plum pox virus strain D iso-
- lates coexist in stone-fruit plantings of Nikita Botanical Gardens, Crimea // Acta Hort. 2017. Vol. 1163. P. 117–122.
8. Chirkov S., Ivanov P., Sheveleva A., Kudryavtseva A., Mitrofanova I. Molecular characterization of Plum pox virus Rec isolates from Russia suggests a new insight into evolution of the strain // Virus Genes. 2018. Vol. 54. N 2. P. 328–332.
9. Wetzel T., Candresse T., Macquaire G., Ravelondro M., Dunez J. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for Plum pox virus detection // J. Virol. Meth. 1992. Vol. 39. N 1–2. P. 27–37.
10. Olmos A., Cambra M., Dasi M.A., Candresse T., Esteban O., Gorris M.T., Asensio M. Simultaneous detection and typing of Plum pox potyvirus (PPV) isolates by hemi-nested PCR and PCR-ELISA // J. Virol. Meth. 1997. Vol. 68. N 2. P. 127–137.
11. Šubr Z., Pittnerova S., Glasa M. A simplified RT-PCR-based detection of recombinant Plum pox virus isolates // Acta Virologica. 2004. Vol. 48. N 3. P. 173–176.
12. Wallis C.M., Stone A.L., Sherman D.J., Damsteegt V.D., Gildow F.E., Schneider W.L. Adaptation of plum pox virus to a herbaceous host (*Pisum sativum*) following serial passages // J. Gen. Virol. 2007. Vol. 88. N 10. P. 2839–2845.

13. Matic S., Elmaghrabi I., Law V., Varga A., Reed C., Myrta A., James D. 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.* 2011. Vol. 93. N 2. P. 303–310.
14. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. Vol. 33. N 7. P. 1870–1874.
15. Boscia D., Zeramdini H., Cambra M., Potere O., Gorris M.T., Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V. Production and characterization of a monoclonal antibody specific to the M serotype of plum pox potyvirus // *Eur. J. Plant Pathol.* 1997. Vol. 103. N 5. P. 477–480.
16. Cambra M., Asensio M., Gorris M.T., Perez E., Camarasa T., Garcia J.A., Moya J.J., Lopez-Abella D., Vela C., Sanz A. Detection of plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins // *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 1994. Vol. 24. N 3. P. 569–577.
17. 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. Molecular, ultrastructural, and biological characterization of Pennsylvania isolates of *Plum pox virus* // *Phytopathology.* 2011. Vol. 101. N 5. P. 627–636.
18. Dallot S., Glasa M., Jevremovic D., Kamenova I., Paunovic S., Labonne G. Mediterranean and central-eastern European countries host viruses of two different clades of *Plum pox virus* strain M // *Arch. Virol.* 2011. Vol. 156. N 3. P. 539–542.
19. Gurcan K., Teber S., Caglayan K. Further investigation of a genetically divergent group of plum pox virus-M strain in Turkey // *J. Plant Pathol.* 2019. Vol. 101. N 2. P. 385–391.
20. Candresse T., Saenz P., Garcia J. A., Boscia D., Navratil M., Gorris M.T., Cambra M. Analysis of the epitope structure of *Plum pox virus* coat protein // *Phytopathology.* 2011. Vol. 101. N 5. P. 611–619.
21. Matic S., Rwhannih M., Myrta A. Diversity of *Plum pox virus* isolates in Bosnia and Herzegovina // *Plant Pathol.* 2006. Vol. 55. N 1. P. 11–17.
22. Glasa M., Palkovics L., Kominek P., Labonne G., Pittnerova S., Kudela O., Candresse T., Subr Z. 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.* 2004. Vol. 85. N 9. P. 2671–2681.
23. Gurcan K., Teber S., Candresse T. Genetic analysis suggests a long and largely isolated evolutionary history of plum pox virus strain D in Turkey // *Plant Pathol.* 2020. Vol. 69. N 2. P. 370–378.
24. Приходько Ю.Н., Живаева Т.С., Шнейдер Ю.А. Скрининговые методы выявления комплекса штаммов вируса шарки слив (PPV) // *Садоводство и виноградарство.* 2019. № 1. С. 36–42.

Поступила в редакцию 09.04.2020 г.

После доработки 11.05.2020 г.

Принята в печать 15.05.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

Molecular characterization of new Crimean *Plum pox virus* isolates

A.A. Sheveleva¹, I.V. Mitrofanova², V.M. Gorina², S.N. Chirkov^{1,2,*}

¹Department of Virology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Nikita Botanical Gardens—National Scientific Center of Russian Academy of Sciences, Nikitskiy Spusk 52, Nikita, Yalta, 298648, Russia

*e-mail: s-chirkov1@yandex.ru

Molecular analysis of new *Plum pox virus* (PPV) isolates found in peach, apricot, and plum cultivar collections of the Nikita botanical gardens—National scientific center of the Russian Academy of Sciences (NBS), as well as in wild myrobalans growing in the surrounding area was performed. Nineteen new PPV isolates were detected using ELISA and immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction. Most of them belonged to the strain D; one isolate of the strain Rec and another one belonging to the strain M were also found. 3'-terminal genomic sequences of new isolates encompassing the coat protein (CP) gene and flanking sequences of the *NIb* gene and 3'-untranslated region were sequenced. Phylogenetic analysis of the 3'-terminal sequences assigned PPV-D isolates to several clusters or clades. The average level of divergence of new and previously characterized Crimean PPV-D isolates was 2%. The comparatively high genetic diversity of the strain D isolates from the Crimea suggests a long-standing introduction of their ancestors to the NBS. The H23 isolate found in the apricot cultivar collection belonged to the strain M. This is the first PPV-M detection in the Crimea. The strain Rec Al-Ch isolate was revealed on a wild myrobalan tree. A K59T mutation was found in the CP of the K87 isolate (strain D), which impairs its recognition by PPV-D-specific monoclonal antibody 4DG5. Amino acid substitutions were found in position 68 of the CP of the Al-Ch as well as previously characterized Russian K28 and Kisl-

lpl strain Rec isolates. These substitutions did not affect the recognition of these isolates by PPV-M-specific monoclonal antibody AL suggesting that position 68 seems to be outside the epitope. In all likelihood, PPV entered the NBS as a result of several independent introductions of the infected stone fruit crops from various regions of the world and spread along the plantings by aphids.

Keywords: *stone fruit crops, germplasm collection, plum pox virus, phylogenetic analysis, epitope, monoclonal antibody*

Сведения об авторах

Шевелева Анна Александровна – науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-56-26; e-mail: anncsh@yandex.ru

Митрофанова Ирина Вячеславовна – чл.-корр. РАН, докт. биол. наук, зав. отделом биологии развития растений, биотехнологии и биобезопасности Никитского ботанического сада – Национального научного центра РАН. Тел.: 8-365-425-08-59; e-mail: irimitrofanova@yandex.ru

Горина Валентина Мелентьевна – докт. с.-х. наук, вед. науч. сотр. лаборатории южных плодовых и орехоплодных культур Никитского ботанического сада – Национального научного центра РАН. Тел.: 8-365-425-05-16; e-mail: valgorina@yandex.ru

Чирков Сергей Николаевич – докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-56-26; e-mail: s-chirkov1@yandex.ru