ВИРУСОЛОГИЯ

УДК 634.22:632.3:578.864

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ОСПЫ СЛИВЫ ШТАММА WINONA

А.В. Закубанский, А.А. Шевелева, С.Н. Чирков*

Кафедра вирусологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
** email: s-chirkov1@yandex.ru*

Вирус оспы сливы (*Plum pox virus*, PPV, род *Potyvirus*, сем. Potyviridae) является экономически наиболее значимым вирусным патогеном косточковых культур, принадлежащих к роду *Prunus*. Штамм Winona (PPV-W) — самый вариабельный из девяти известных штаммов вируса и один из самых распространенных в европейской части России. Шесть новых изолятов PPV-W были выявлены впервые в зеленых насаждениях г. Москвы (Kp2U, Avang, Pulk, Pulk-1), в Талдомском районе Московской области (Karm) и в Ковровском районе Владимирской области (Vlad-4) на дикорастущих деревьях сливы *Prunus domestica*. 3'-Терминальный сегмент генома новых изолятов отличался высоким уровнем изменчивости. Изучение их родственных связей с другими изолятами этого штамма посредством филогенетического анализа последовательности гена белка оболочки показало отсутствие кластеризации российских изолятов PPV-W по географическому принципу. Инокуляция растений *Nicotiana benthamiana* хмелевой тлей *Phorodon humuli* с деревьев сливы, зараженных изолятами Avang и Pulk, и чертополоховой тлей *Brachycaudus cardui* с дерева, зараженного изолятом Kp2U, приводила к системной вирусной инфекции в индикаторных растениях, что указывало на возможность распространения PPV-W обоими видами тли в природе. Передачу PPV-W через семена установить не удалось.

Ключевые слова: *вирус оспы сливы, штамм Winona, филогенетический анализ, хмелевая тля Phorodon humuli, чертополоховая тля Brachycaudus cardui.*

Вирус оспы сливы (*Plum pox virus*, PPV, род *Potyvirus*, сем. Potyviridae) является экономически наиболее значимым вирусным патогеном косточковых культур, принадлежащих к роду *Prunus*. Вызываемое им заболевание ("шарка") приводит к снижению урожая и ухудшению качества плодов [1]. Вирусный геном представлен однонитевой молекулой РНК положительной полярности длиной 9,8 тыс. нуклеотидов (нт) с организацией, типичной для потивирусов. В зараженных клетках геномная РНК транслируется с образованием полипротеина, который разрезается вирус-специфическими протеазами на 10–11 функционально активных белков. От растения к растению вирус передается при вегетативном размножении, а также различными видами тли. Известно девять штаммов вируса: D, M, C, CR, W, Rec, EA, T и An. Штаммы различаются по нуклеотидной последовательности геномной РНК, антигенным и эпидемиологическим свойствам, географическому распространению, кругу хозяев и патогенности для различных видов косточковых культур [2].

Штамм W (Winona) (PPV-W) встречается преимущественно на территории бывшего СССР. Два изолята, обнаруженные в Канаде [3, 4] и США [5], имеют украинское происхождение. Других изолятов PPV-W за пределами бывшего СССР до сих пор не выявлено. Напротив, в европейской части России изоляты этого штамма распространены очень широко [6]. Анализ их геномов показал, что PPV-W является самым вариабельным из известных штаммов вируса, в частности, вследствие широкого распространения внутриштаммовой рекомбинации [7, 8]. Поэтому молекулярный анализ каждого нового изолята представляет большой интерес для оценки степени генетической изменчивости PPV и понимания его эволюции. Кроме того, биологические свойства PPV-W практически не изучены.

В данной работе исследовали шесть новых изолятов PPV-W, выявленных на дикорастущих деревьях сливы в Москве, а также в Московской и Владимирской областях. Посредством филогенетического анализа геномов изучены их родственные связи с другими изолятами этого штамма. Также исследована возможность передачи изолятов штамма W тлями и через семена.

Материалы и методы

Изоляты Avang, Kp2U, Pulk и Pulk-1 обнаружены на дикорастущих деревьях сливы (*P. domestica*) в зеленых насаждениях на севере г. Москвы. Изолят Karm выявлен на корневой поросли сливы в Талдомском районе Московской области, а изолят Vlad-4 — на сливе в Ковровском районе Владимирской области. Все изоляты индуцировали типичные симптомы шарки на листьях зараженных

растений. Лабораторную диагностику вируса осуществляли посредством иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью набора Reagent set SRA 31505 (Agdia, США) и иммуноспецифической полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с универсальными праймерами, выявляющими любые изоляты вируса [9], как описано ранее [10]. Штамм изолятов определяли методом ОТ-ПЦР с набором праймеров, разработанных для идентификации различных штаммов вируса [11–15]. 3'-Терминальный сегмент генома, включающий ген белка оболочки (БО) и прилегающие последовательности гена NIb и 3'-нетранслируемого региона, амплифицировали методом ОТ-ПЦР с праймерами P3dW/4CPR1 [16]. Продукты ПЦР размером 1211 п.н. выделяли из агарозного геля с помощью набора Cleanup Standard (Евроген, Россия) и секвенировали в обоих направлениях методом Сэнгера в фирме Евроген. Последовательности гена БО новых изолятов депонированы в базе данных GenBank (http://ncbi.nlm.nih.gov/) под номерами KU359729 (Avang), KU359730 (Karm), KU359731 (Kp2U), KU359732 (Pulk), KU359733 (Pulk-1) и KU359734 (Vlad-4). Для филогенетического анализа использовали все доступные в GenBank последовательности гена БО изолятов PPV-W: W3174 (AY912055), RD4 (HG916856), STNB1 (HG916857), STNB2 (HG916858), PD2 (HG916859), P2-1 (HG916860), P3 (HG916861), 1410-7 (HG916862), 1410-1 (HG916863), 1410 (HQ326086), LV-141pl (HQ670746), LV-145bt (HQ670748), UKR44189 (JN596110), BY (JQ970438), P1 (JQ970439), Pk (KC347608), P2-2 (LN852400). Анализ генетического разнообразия последовательностей и филогенетический анализ выполняли с помощью программы MEGA 6.06 [17].

Для определения вида тли, колонизирующей побеги зараженных деревьев, использовали определитель насекомых [18]. Возможность переноса вируса тлей изучали, как описано ранее [19]. Тлю с деревьев сливы, зараженных изолятами Kp2U, Pulk и Avang, переносили на растения *Nicotiana benthamiana* по 25–40 особей на 1–2 листа среднего яруса. Каждый изолят инокулировали в 5–6 растений. Вирус в индикаторных растениях определяли через 2–3 нед. после инокуляции с помощью ОТ-ПЦР. Вирофорность тлей определяли методом ОТ-ПЦР, используя в качестве матрицы для обратной транскрипции тотальную РНК, выделенную из тлей при помощи наборов RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Германия). По 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 протоколом фирмы. Для изучения возможности передачи PPV-W семенами собирали плоды с зараженных деревьев, отделяли косточки от мякоти, обрабатывали их раствором марганцовокислого калия и стратифицировали во влажном субстрате в течение 5–6 мес. при температуре 2–4°С до прорастания. Наличие вируса в сеянцах сливы определяли методом ОТ-ПЦР через 5–7 нед. после их высаживания в стерильный почвенный субстрат.

Результаты и обсуждение

Методами ИФА и ОТ-ПЦР вирус был выявлен во всех исследованных образцах растений сливы с симптомами шарки. При использовании в ОТ-ПЦР праймеров, специфичных к штамму W, образовывался продукт ожидаемого размера (327 п.н.) [13] (данные не представлены). Амплификации с праймерами, специфичными к другим штаммам вируса, не наблюдали. Таким образом, анализируемые изоляты очевидно принадлежат к штамму W. Ранее PPV-W был выявлен в различных регионах Европейской России, а также в Латвии на сливе (*P. domestica*), терне (*P. spinosa*), войлочной вишне (*P. tomentosa*) и алыче (*P. cerasifera*) [6, 10, 16, 20, 21]. В Москве изоляты этого штамма были обнаружены в коллекционных насаждениях Главного ботанического сада имени Н.В. Цицина РАН на сливе канадской (*P. nigra*) и терне [10, 22]. В зеленых насаждениях г. Москвы, на севере Московской области и во Владимирской области PPV-W обнаружен впервые. Эти находки являются еще одним подтверждением повсеместного распространения изолятов штамма W в европейской части России. В среднем, с учетом новых изолятов, последовательности гена БО PPV-W различались на 5,1%, что соответствует данным о степени вариабельности полногеномных последовательностей PPV-W [8] и свидетельствует о высоком уровне генетического разнообразия внутри штамма W.

Результаты филогенетического анализа гена БО новых изолятов PPV-W представлены на рис. 1. Изоляты Avang, Pulk и Pulk-1 образуют одну группу. Деревья сливы, на которых обнаружены эти изоляты, находятся в сотнях метров одно от другого и колонизируются одним и тем же видом предполагаемого переносчика вируса — хмелевой тлей *Phorodon humuli* (Schr.). Интересно, что эти три изолята связаны общностью происхождения с изолятами 1410 и PD2 из коллекции косточковых культур Главного ботанического сада имени Н.В. Цицина РАН [10, 22]. Возможно, сравнительная близость местообитания растений-хозяев способствовала естественному распространению предка этих изолятов тлей-переносчиком. Еще один московский изолят Kp2U близкородственен изоляту RD4, обнаруженному на войлочной вишне в Раменском районе Московской области [10]. Следует отметить, что все изоляты, входящие в эту группу, выявлены в Московской области, за исключением изолята Pk, который обнаружен на дикорастущей сливе в Тверской области [16].

Хотя в ряде случаев группирование изолятов по топографическому принципу, видимо, может иметь место, в целом кластеризация российских изолятов PPV-W по географическому принципу отсутствует.

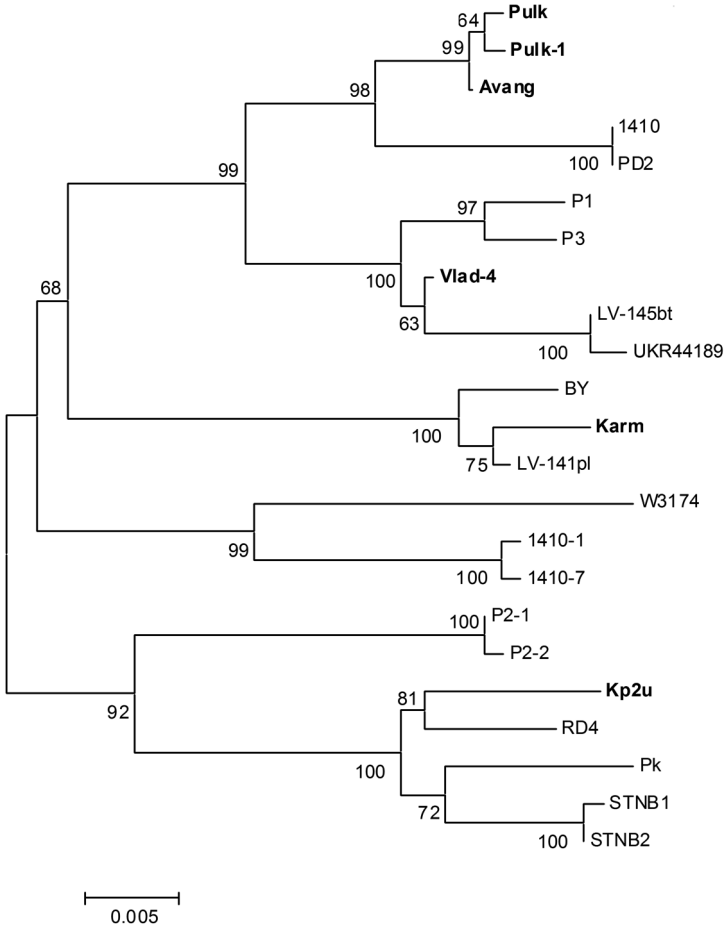

Рис. 1. Филогенетическое дерево, реконструированное методом присоединения соседей на основе последовательностей гена белка оболочки изолятов вируса оспы сливы штамма Winona. Названия изолятов указаны на концах ветвей. Наименования изолятов, изученных в данной работе, выделены жирным шрифтом. Результаты бутстрэп-анализа из 1000 случайных выборок (в процентах) указаны рядом с узлами. Масштабная черта показывает число замен на один нуклеотид. Номера последовательностей, использованных в филогенетическом анализе, в базе данных GenBank приведены в разделе "Материалы и методы". Филогенетический анализ выполнен с помощью программы MEGA6 (17)

Так, изолят Karm из Талдомского района Московской области кластеризуется с изолятом BY из Белгородской области и с изолятом LV-141pl из Латвии, причем латвийский изолят считается наиболее близким к предполагаемому предку этого штамма [21]. Аналогичным образом, изолят Vlad-4 из Владимирской области кластеризуется с изолятами P1 и P3 из Ставропольского края [8, 10] и с изолятами LV-145bt из Латвии и UKR44189 из Украины [5, 21].

Известно, что ген БО PPV-W может состоять из 990 или 993 нт. Это различие связано с делецией нуклеотидов Т, А, Г из соседних триплетов в 5'-проксимальном участке гена БО у ряда изолятов [8, 10, 21]. Филогенетический анализ показал, что последовательности гена БО длиной 990 нт (изоляты Pulk, Pulk-1, Avang, 1410, PD2, P1, P3, Vlad-4, LV-145bt, UKR44189) формируют отдельный кластер (рис. 1). Однако в него не входит изолят BY, ген БО которого тоже состоит из 990 нт. Возможно, входящие в этот кластер изоляты представляют собой отдельную ветвь эволюции PPV-W.

Штамм W является самым изменчивым из всех известных штаммов PPV, а последовательность гена БО, кодирующая N-терминальный домен БО, является наиболее вариабельным участком генома [2]. Поэтому филогенетический анализ гена БО, очевидно, вполне достоверно отражает родственные связи между изолятами. Об этом же свидетельствуют высокие значения бутстрэп-анализа и близость топологии филогенетического дерева, представленного в данной статье, к дереву, реконструированному на основе полногеномных последовательностей изолятов этого штамма [8].

В природных условиях PPV распространяется от растения к растению различными видами тли неперсистентным способом [2, 19]. Деревья сливы, зараженные изолятами Avang и Pulk, были колонизированы хмелевой тлей *Ph. humuli*, а дерево, зараженное изолятом Kp2U, было колонизировано чертополоховой тлей *Brachycaudus cardui* (L.). Эти виды тли известны как переносчики PPV [19], однако возможность переноса ими изолятов штамма W не была изучена.

Методом ОТ-ПЦР с праймерами, специфичными к штамму W [13], вирус легко определялся в листьях, колонизированных тлями (рис. 2, а). В то же время, анализ тотальной РНК из тлей, собранных с зараженных побегов, выявил вирус только в *B. cardui* со сливы, зараженной изолятом Kp2U (рис. 2, б). Несмотря на это, инокуляция растений *N. benthamiana* тлями *Ph. humuli* с деревьев сливы, зараженных изолятами Avang и Pulk, и тлями *B. cardui* с дерева, зараженного изолятом Kp2U, приводила к инфицированию индикаторных растений. Методом ОТ-ПЦР вирус был обнаружен как в инокулированных, так и в неинокулированных листьях,

что указывало на возможность переноса изолятов PPV-W обоими видами тлей (рис. 2, в). Доля зараженных индикаторных растений зависела от изолята PPV-W и составила для Avang — три растения из пяти зараженных, для Pulk — четыре растения из шести, и для Kp2U — пять растений из пяти инокулированных. Возможно, высокая эффективность передачи изолята Kp2U является следствием существенно бóльшего количества вируса в тлях *B. cardui* (рис. 2, б). Высокое содержание PPV в переносчике не характерно для неперсистентного 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 [22].

Некоторые потивирусы могут распространяться семенами [23]. Изоляты PPV штаммов D и M семенами не передаются [24], но штамм W в этом отношении не был изучен. Методом ОТ-ПЦР были проанализированы 47 растений сливы, выращенных из семян с зараженных деревьев. Ни в одном из сеянцев вирус выявить не удалось. Типичные симптомы вирусной инфекции не развивались. По-видимому, изоляты PPV штамма W семенами не передаются.

Находки новых изолятов PPV-W в географически отдаленных регионах еще раз свидетельствуют о повсеместном распространении штамма W в европейской части России в результате обмена

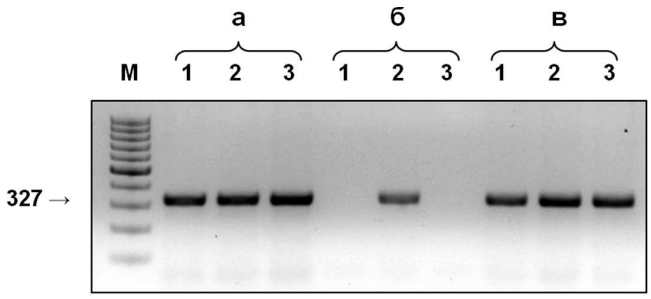

Рис. 2. Определение вируса оспы сливы в листьях сливы, колонизированных тлей (а), в тле (б) и в системных листьях *Nicotiana benthamiana* через 3 нед. после инокуляции тлей (в) методом ОТ-ПЦР. Изоляты: Avang (1), Kp2U (2), Pulk (3). Электрофорез в 2%-ном геле агарозы. Окрашивание бромистым этидием. Стрелка указывает положение специфического продукта ОТ-ПЦР размером 327 п.н. M — маркеры GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas)

зараженным материалом косточковых культур и наличия эффективных переносчиков вируса. Широкое распространение этого штамма, его отсутствие за пределами бывшего СССР и высокая вариабельность генома могут указывать на происхождение штамма W в России или сопредельных странах, что согласуется с предположениями о восточноевропейском происхождении PPV-W [4, 6].

Авторы благодарны д-ру Аскару Ахатову за определение видов тли. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00007).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cambra M., Capote N., Myrta A., Llacer G. Plum pox virus* and the estimated costs associated with sharka disease // EPPO Bull. 2006. Vol. 36. N 2. P. 202–204.

2. *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.

3. *James D., Varga A., Thompson D., Hayes S.* Detection of a new and unusual isolate of Plum pox virus in plum (*Prunus domestica*) // Plant Dis. 2003. Vol. 87. N 9. P. 1119–1124.

4. *James D., Varga A.* Nucleotide sequence analysis of *Plum pox virus* isolate W3174: evidence of a new strain // Virus Res. 2005. Vol. 110. N 1–2. P. 143–150.

5. *Mavrodieva V., James D., Williams K., Negi S., Varga A., Mock R., Levy L.* 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. 2013. Vol. 97. N 1. P. 44–52.

6. *Чирков С.Н., Приходько Ю.Н.* Генетическое разнообразие и структура популяции вируса оспы (шарки) сливы в России // Сельскохозяйственная биология. 2015. Т. 50. № 5. С. 529–539.

7. *Sheveleva A., Ivanov P., Chirkov S., Prihodko Y., Varga A., James D.* Plum pox virus W appears to be the most variable strain of the seven recognized strains of the virus // Petria. 2012. Vol. 22. N 3. P. 226–232.

8. *James D., Sanderson D., Varga A., Sheveleva A., Chirkov S.* Analysis of the complete genome sequences of new isolates of the genetically diverse Winona strain of Plum pox virus (PPV W) and the first definitive evidence of intra-strain recombination events // Phytopathology. 2016. Vol. 106. N 4. P. 407–416.

9. *Wetzel T., Candresse T., Macquaire G., Ravelonandro 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. *Sheveleva A., Ivanov P., Prihodko Y., James D., Chirkov S.* Occurrence and genetic diversity of Winona-like *Plum pox virus* isolates in Russia // Plant Dis. 2012. Vol. 96. N 8. P. 1135–1142.

11. *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 heminested PCR and PCR-ELISA // J. Virol. Meth. 1997. Vol. 68. N 2. P. 127–137.

12. *Nemchinov L., Hadidi A.* Specific oligonucleotide primers for the direct detection of plum pox potyvirus-cherry subgroup // J. Virol. Meth. 1998. Vol. 70. N 2. P. 231–234.

13. *James D., Varga A.* Preliminary molecular characterization of *Plum pox virus* isolate W3174: evidence of a new strain // Acta Hortic. 2004. Vol. 657. P. 177–182.

14. *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.

15. *Glasa M., Prikhodko Y., Predajna L., Nagyova A., Shneyder Y., Zhivaeva T., Šubr Z., Cambra M., Candresse T.* Characterization of sour cherry isolates of *Plum pox virus* from the Volga basin in Russia reveals a new cherry strain of the virus // Phytopathology. 2013. Vol. 103. N 9. P. 972–979.

16. *Sheveleva A., Kudryavtseva A., Speranskaya A., Belenikin M., Melnikova N., Chirkov S.* Complete genome sequence of a novel *Plum pox virus* strain W isolate determined by 454 pyrosequencing // Virus Genes. 2013. Vol. 47. N 2. P. 385–388.

17. *Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // Mol. Biol. Evol. 2011. Vol. 28. N 10. P. 2731–2739.

18. Определитель насекомых Европейской части СССР: В 5 т. / Под ред. Г.Я. Бей-Биенко. Т. 1. М.; Л.: Наука, 1964. 936 с.

19. *Labonne G., Yvon M., Quiot J.B., Avinent L., Llacer G.* Aphids as potential vector of plum pox virus: comparison of methods of testing and epidemiological sequences // Acta Hortic. 1995. Vol. 386. P. 207–216.

20. *Приходько Ю.Н., Мазурин Е.С., Живаева Т.С., Шнейдер Ю.А., Соколова Е.Е.* Изучение штаммов вируса шарки сливы // Защита и карантин растений. 2011. № 11. С. 29–32.

21. *Glasa M., Malinowski T., Predajna L., Pupola N., Dekena D., Michalczuk L., Candresse T.* Sequence variability, recombination analysis and specific detection of the W strain of *Plum pox virus* // Phytopathology. 2011. Vol. 101. N 8. P. 980–985.

22. *Sheveleva A., Chirkov S., Nemova E.* Detection of a new Winona-like Plum pox virus isolate in naturally infected Canadian plum (*Prunus nigra*) in Russia // Acta Hortic. 2011. Vol. 899. P. 49–56.

23. *Simmons H.E., Munkvold G.P.* Seed transmission in the Potyviridae // Global perspectives of the health of seeds and plant propagation material / Eds. M.L. Gullino and G.P. Munkvold. Dordrecht: Springer, 2014. P. 3–15.

24. *Pasquini G., Simeone A.M., Conte L., Barba M.* RT-PCR evidence of the non-transmission through seed of Plum pox virus strains D and M // J. Plant Pathol. 2000. Vol. 82. N 3. P. 221–226.

Поступила в редакцию
30.12.15

MOLECULAR AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF NOVEL ISOLATES OF PLUM POX VIRUS STRAIN WINONA

A.V. Zakubanskiy, A.A. Sheveleva, S.N. Chirkov*

Department of Virology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia
** email: s-chirkov1@yandex.ru*

Plum pox virus (PPV, genus *Potyvirus*, family Potyviridae) is considered to be the most detrimental viral pathogen of stone fruit crops (*Prunus* spp.). The strain Winona (PPV-W) is the most variable strain of the nine recognized strains of the virus and is one of the most common in European Russia. Six new PPV-W isolates were first found in decorative green plantings of the city of Moscow (Kp2U, Avang, Pulk, Pulk-1), also in the Taldom district of the Moscow region (Karm) and in the Kovrov district of the Vladimir region (Vlad-4) on wild plums *Prunus domestica*. Analysis of the 3'-terminal genome segment of the novel isolates confirmed the high level of the PPV-W intra-strain diversity. Study of their relationship with other PPV-W isolates using the phylogenetic analysis of the coat protein gene's sequences revealed no geographical clustering of the Russian PPV-W isolates. The aphid and seed transmission of the PPV-W was also investigated. Inoculation of *Nicotiana benthamiana* plants by the hop aphid *Phorodon humuli* from the plums, infected with the isolates Avang and Pulk, and by the thistle aphid *Brachycaudus cardui* from the plum, infected with the isolate Kp2U, was shown to result in the systemic infection of tobacco plants thus indicating the possibility of the natural PPV-W transmission by both aphid species. No evidence of the PPV-W seed transmission has been obtained.

Key words: *plum pox virus, strain Winona, phylogenetic analysis, hop aphid Phorodon humuli, thistle aphid Brachycaudus cardui.*

Сведения об авторах:

Закубанский Александр Владимирович — аспирант кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-56-26; e-mail: zakubanskiy93@mail.ru

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