

УДК 634.1.055:578.864

## МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ВЫЯВЛЕНИЮ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСА ШАРКИ СЛИВЫ (*PLUM POX VIRUS*) НА РАЗНЫХ ВИДАХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *PRUNUS*

И.В. МИТРОФАНОВА<sup>1</sup>, О.В. МИТРОФАНОВА<sup>1</sup>, С.Н. ЧИРКОВ<sup>2</sup>,  
Н.П. ЛЕСНИКОВА-СЕДОШЕНКО<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Никитский ботанический сад – Национальный научный центр, г. Ялта

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва

Представлены методические подходы и результаты многолетних исследований, касающихся мониторинга распространения вируса шарки сливы (*Plum pox virus*) на юге Украины и в Крыму. В работе имеется информация о самом вредном организме и симптомах болезни, вызываемой вирусом шарки сливы. Отражена характеристика *Plum pox virus* и особенности выявления фитопатогена. Продемонстрированы основные методы идентификации вируса шарки сливы: биологический метод, методы ИФА, ИХА и ПЦР-анализа.

**Ключевые слова:** вирус шарки сливы, мониторинг, симптомы, методы идентификации.

### Введение

Несмотря на то, что в большинстве стран вирус шарки сливы (*Plum pox potyvirus* или PPV) считается карантинным объектом, он очень распространён в насаждениях косточковых плодовых культур практически во всём мире. Обычно считают, что эпидемия PPV началась вначале прошлого века на Балканах. Впервые шарка была зафиксирована на сливе европейской (*Prunus domestica* L.) в Болгарии в 1917-1918 гг. и описана как вирусная болезнь в 1932 г. С тех пор вирус распространился по большей части территории Европы, на Средний Восток (Турция, Иран, Сирия), в Африку (Египет, Тунис), Азию (Индия, Китай, Казахстан, Пакистан) в конце XX века проник в Новый Свет (Чили, Аргентина, США, Канада). В 2009 году PPV был впервые выявлен в Японии [35].

Ежегодный экономический ущерб во всём мире оценивается в 10000 миллионов евро, а количество выкорчеванных и уничтоженных в последние годы зараженных деревьев исчисляется миллионами [17].

PPV – вид рода *Potyvirus* семейства *Potyviridae*. Вирусные частички представляют собой изогнутые палочки размером 700 нм x 11 нм, состоящие из однониточной молекулы РНК примерно с 10000 нуклеотидов, покрытой 2000 субъединицами единственного белка оболочки. Главным источником распространения вируса шарки сливы являются зараженные деревья рода *Prunus*. Вирус передаётся и распространяется с посадочным материалом, а также насекомыми-переносчиками. Основным путём распространения вируса PPV в промышленных садах является осенний перенос его крылатыми тлями, откладывающими зимние яйца на плодовых деревьях. После инокуляции инкубационный период может длиться несколько месяцев, а системное распространение продолжается даже несколько лет. Доказан перенос вируса шарки пыльцой и семенами.

Изоляты PPV можно классифицировать на семь типов, или штаммов: *D* (Dideron), *M* (Marcus), *C* (Cherry), *EA* (El Amar), *W* (Winona), *Rec* (Recombinant) и *T* (Turkish) [19, 29, 44]. Штаммы различаются по патогенности; так, изоляты штамма *M* вызывают более быстрое развитие болезни и более серьёзные её симптомы, чем изоляты штамма *D* на абрикосе (*P. armeniaca* L.), сливе (*P. domestica*), персике (*P. persica* (L.) Batsch) и сливе китайской (*P. salicina* Lindl.). Изоляты *EA* географически

ограничены территорией Египта, и об их эпидемиологии и биологических свойствах имеется очень мало информации. В некоторых европейских странах недавно были идентифицированы изоляты PPV, заражающие черешню (*P. avium* (L.) L.) и вишню (*P. cerasus* L.). Данные изоляты формируют отдельный тип, названный PPV-C. В Канаде из растения сливы европейской (*P. domestica*) был выделен атипичный изолят PPV-W, представляющий собой отличный от остальных штамм. Кроме того, естественные рекомбинанты между штаммами *D* и *M* были описаны как штамм PPV-Rec, проявляющий эпидемиологические свойства, подобные штамму *D*. Недавно в Турции сообщалось о выявлении рекомбинантного изолята другого типа (типа *T*).

PPV присуща чёткая молекулярная вариабельность некоторых участков генома, прежде всего гена белковой оболочки (БО) и генов РЗ-6К1. Самой вариабельной частью молекулы БО является иммунодоминантный N-конец длиной 93 аминокислоты, в котором сосредоточено большинство штаммспецифичных эпитопов. Антигенные отличия N-конца молекулы БО стали основанием для группировки большинства известных изолятов вирусу в 7 типов, или штаммов.

В исследованиях предыдущих лет также показано присутствие PPV в насаждениях косточковых плодовых культур в различных регионах Украины и выявлена тенденция его распространения в т.ч. на Южном берегу Крыма [8, 9, 14, 31]. В настоящее время идентифицированы несколько изолятов, выявленных в различных агроклиматических зонах Крыма, и показана их принадлежность к штаммам *D* [1, 3, 5] и *Rec*.

Целью наших исследований было не только выявление в насаждениях косточковых плодовых культур вируса шарки сливы, его лабораторная идентификация, но и разработка методических подходов к проведению мониторинга распространения карантинных фитопатогенов в Республике Крым.

### Объекты и методы исследований

Основным объектом исследования был вирус шарки сливы (*Plum pox potyvirus*), распространённый в насаждениях косточковых плодовых культур (персика, нектарина, абрикоса, сливы и алычи) на юге Украины и в Крыму. Для идентификации вируса в отобранных нами образцах косточковых плодовых культур использовали биологический тест, иммунохимические методы анализа (ИХА), методы иммуноферментного анализа (ИФА) и анализа полимеразной цепной реакции (ПЦР-анализ).

### Результаты и обсуждения

#### Информация о вредном организме

**Таксономическая информация.** Научное название: *Plum pox virus* (PPV). Синоним: Вирус шарки сливы. Таксономическая позиция: род *Potyvirus*, семейство Potyviridae. Общие названия: шарка, оспа сливы

**Распространённость и хозяева PPV.** В настоящее время болезнь шарки сливы имеет следующий статус распространённости в различных странах мира: широкое (высокий уровень) – в Хорватии, Германии, Греции, Болгарии, Венгрии, Польше, Румынии, России, Сербии, Словакии; ограниченное распространение (гетерогенный уровень) – в Албании, Аргентине, Австрии, Канаде, на Кипре, в Чехии, Египте, Франции, Италии, Иране, Казахстане, Люксембурге, Молдове, Норвегии, Пакистане, Португалии, Южной части России, Словении, Испании, Сирии, Турции, Великобритании, США и на Украине; ввезен и создан – на Азорских островах, в Боснии и Герцеговине, Чили, некоторых государствах бывшего СССР, в том числе странах Центральной Азии, Индии, Иордании, Латвии, Нидерландах, Швейцарии, Тунисе; ввезен и присутствует – в Бельгии, Дании; отсутствует – в Эстонии, Финляндии, Ирландии, Израиле, Ливане, на Мальте, в Марокко, Палестине, Швеции; неизвестен – в Ливии [42].

На Украине (в Черновицкой области) вирус шарки сливы впервые был зарегистрирован в 1966 г. [11]. В настоящее время очаги заражения шаркой сливы зарегистрированы в 8 регионах Украины (Винницкая, Закарпатская, Ивано-Франковская, Львовская, Николаевская, Одесская, Тернопольская, Черновицкая области) и Республике Крым [6, 7, 10, 12, 31, 36].

Возбудитель поражает почти все косточковые, в т.ч. сливу (*Prunus domestica*), персик (*P. persica*), нектарин (*Prunus persica* (L.) Batsch var. *nectarina* (Aiton) Maxim.), абрикос (*P. armeniaca*), алычу (*P. cerasifera*), миндаль (*P. dulcis* (Mill.) D.A.Webb), черешню (*P. avium*) и вишню (*P. cerasus*), вишню антипку (*P. mahaleb* L.). Терн (*P. spinosa* L.) и тернослива (слива Дамсона, *Prunus domestica* subsp. *insititia* (L.) C.K.Schneid.) являются латентными носителями вируса шарки, при этом на них также отмечены симптомы проявления пораженности вирусом PPV. Такие виды декоративных культур и подвоев также являются хозяевами: *Prunus blireana*, *P. brigantina* Vill., *P. cistena*, *P. glandulosa* Thunb., *Prunus armeniaca* L. var. *holosericea* Batalin, *P. mume* Siebold & Zucc., *P. hortulana* L.H.Bailey, *P. japonica* Thunb., *P. kurdina*, *P. maritima* Marshall, *P. mandschurica* (Maxim.) Koehne, *P. nigra* Aiton, *P. pumila* L., *P. sibirica* L., *P. triloba* Lindl., *P. simonii* Carrière, *P. salicina* Lindl.

Кроме их, резерваторами вируса могут быть следующие сорняки: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., *Chenopodium foetidum* Schrad., *Nicotiana benthamiana* Domin, *N. clevelandii* A.Gray, *N. glutinosa* L., *Campanula rapunculoides* L., *Lycium hamilifolium* Mill., *Urtica dioica* L., *Lamium purpureum* L., *Medicago falcata* L., *Ranunculus sardous* Crantz, *Trifolium repens* L., *Solanum dulcamara* L., *Vicia faba* L., *Pisum majaricum*, *P. sativum* L., *P. pilosus*, *Clematis* sp. L. и другие [2, 42].

**Способы переноса инфекции.** Вирус шарки сливы переносится через посадочный и подвойный материал, механическим путём, пылью и тлями. Тли переносят вирус непersistентно. Он сохраняет инфекционность в организме тлей не более 4 часов и переносится на стилете насекомого [2, 6, 12].

Место инфицирования – преимущественно эпидермис. Процент переноса зависит от штамма вируса и вида растения-хозяина. Самыми активными переносчиками являются персиковая тля – *Myzus persicae*, чертополоховая – *Aphis cardui*, хмелевая – *Phorodon humuli*, люцерновая – *Aphis craccivora*, в теплице – таволговая – *A. spiraeicola*, тля Давидсона – *Myzus varians* Davidson (рис. 1) [2, 32, 34, 42]. Передача персиковой тлей составляет от 41 до 85%.

Возможен перенос с семенами абрикоса, сливы, персика, нектарина, алычи, который может достигать 14%. Однако в природе он наблюдается редко.

#### **Симптомы болезни**

Вирус шарки сливы поражает всю крону дерева. Симптомы шарки сливы в значительной степени зависят от мест произрастания, времени года, вида и сорта *Prunus*, а также от органа растения (плоды или листья). При естественном заражении симптомы появляются через 9-11 месяцев после заражения.

В результате проведенных исследований определены оптимальные сроки проявления внешних признаков болезни отбора сортообразцов – апрель-июнь, август-сентябрь (в периоды формирования розового бутона, распускания цветка, формирования листьев и созревания плодов). Выявлены и описаны самые характерные внешние признаки проявления вируса шарки сливы на различных сортах исследуемых культур, что обеспечит своевременное выявление очагов болезни (рис. 2 – 6).

Развитие и интенсивность симптомов сильно зависят от растения-хозяина и климатических условий; так, вирус может оставаться латентным в течение нескольких лет в холодном климате.

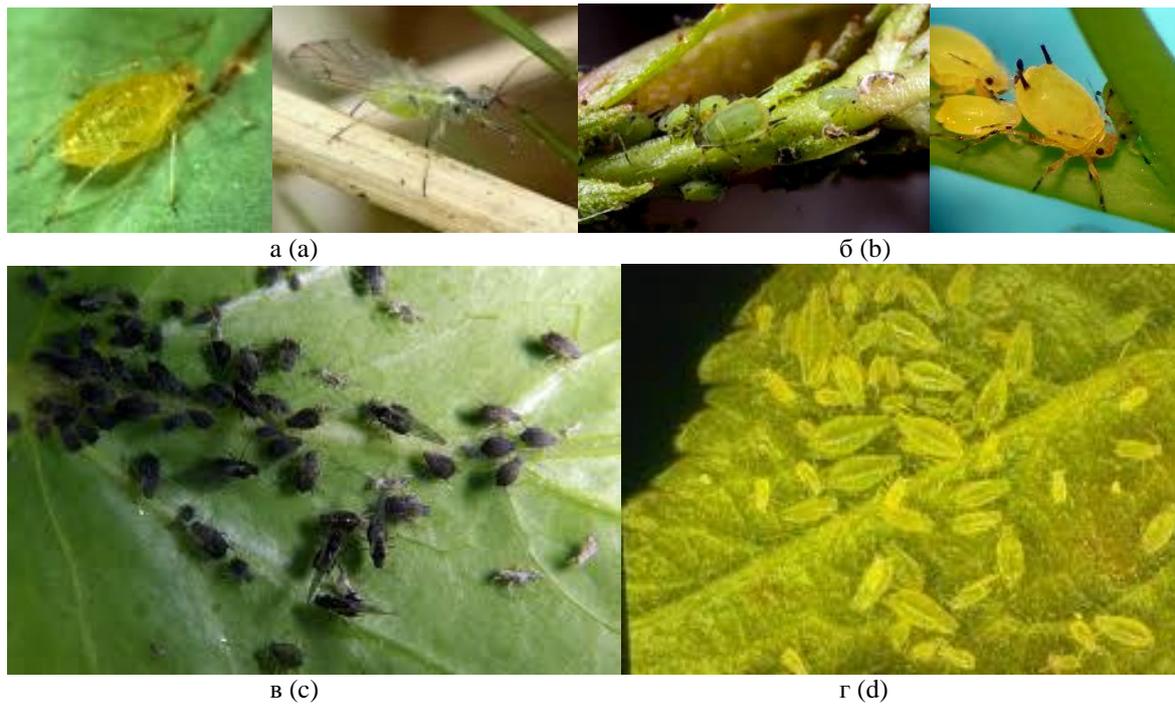


Рис. 1. Переносчики вируса шарки сливы: а) *Myzus persicae*; б) *Aphis spiraeicola*; в) *A. craccivora*; г) *Phorodon humuli*

Fig. 1 Insect vectors of *Plum pox virus*: а) *Myzus persicae*; б) *Aphis spiraeicola*; в) *A. craccivora*; д) *Phorodon humuli*



Рис. 2. Характерные симптомы проявления поражённости PPV на цветках нектарина  
Fig. 2 Typical symptoms of PPV on infected flowers of nectarine



Рис. 3. Цветки персика, поражённые PPV  
Fig. 3 Peach flowers infected by PPV



а (а)  
б (б)

Рис. 4. Симптомы проявления поражённости PPV лепестков и цветков алычи (а) и сливы (б)  
Fig. 4 Syntoms PPV on infected petals and flowers of Cherry plum (a) and plum (b)

Что касается соцветий, то симптомы могут проявиться на лепестках и цветках (обесцвечивание) некоторых сортов персика, абрикоса, сливы, нектарина в результате заражения PPV-D. Проявления болезни имеют четкие симптомы в виде полос и пятен.

Весной на молодых листьях сливы и алычи можно найти расплывчатые светло-зеленые пятна в виде широких полос и колец. На больших листьях окраска пятен бывает желтовато-зелёной, достаточно яркой.



**Рис. 5. Различные симптомы проявления PPV на листьях персика и нектарина в Крыму**  
**Fig. 5 Various symptoms of PPV on leaves of peach and nectarine in Crimea**

На листьях абрикоса весной появляются хлоротические бледно-зеленые линии, кольца, пятна, которые держатся до середины лета. Плоды имеют хлоротические, желтые кольца и часто деформируются, мякоть пропитана камедью. На косточках тоже могут быть видны четкие коричневые пятна, окруженные светлым ореолом. Плоды сливы восприимчивых сортов проявляют сильную деформацию, вдавленные фиолетовые кольца или дуги, бледно-красную окраску мякоти и коричневые пятна на косточках, внутренний гомоз и некроз тканей. У них уменьшается содержание сахара и кислоты, и они становятся полностью невкусными.

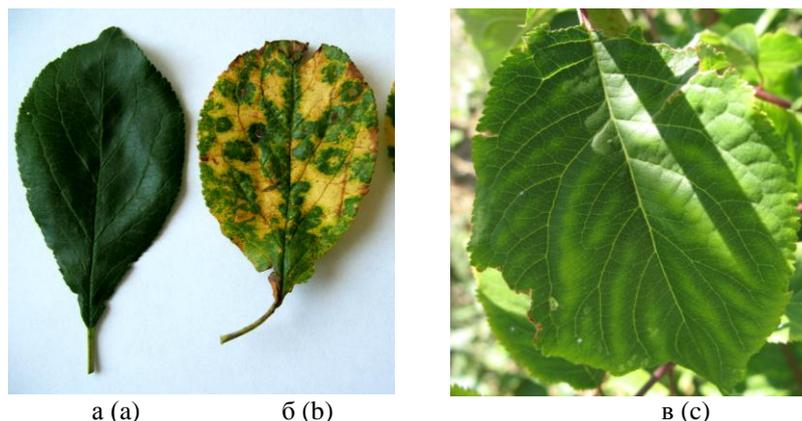


Рис. 6. Симптомы проявления PPV на листьях сливы (а – лист здорового растения; б, в – поражённого)

Fig. 6 Symptoms of PPV on leaves of plum (a – leaf of healthy plant; b, c – infected leaf)

У персика на листьях наблюдается хлороз вторичных-четвертичных жилок, но обычно данный симптом тяжело наблюдать в садах. Симптомы на плодах видны чётко через 4-6 недель до созревания. Они представляют собой белые, красные или зеленоватые кольца (пятна) на белоплодных, красно- и желтоплодных сортах соответственно. На очень восприимчивых сортах может наблюдаться слабая деформация. Подобные симптомы отмечены на нектарине (рис. 7). Плоды могут иметь неправильную форму, и на них под обесцвеченными кольцами могут развиваться бурые или некротические участки. Зараженные плоды могут иметь коричневую или гнилую мякоть и плохое качество. При сильной степени заражения инфицированные плоды преждевременно опадают. Как правило, на плодах ранних сортов развиваются более чёткие симптомы, чем на поздних сортах.

Симптомы на листьях алычи и мирабели имеют вид пятен, колец и полос различной формы. На плодах в основном некрозы и деформация отсутствуют, но могут и выявиться в виде отдельных вдавленных пятен и колец.

На косточках зараженных растений абрикоса (*P. armeniaca*) развиваются типичные светлые кольца или пятна. Алкогольные и спиртовые напитки из зараженных плодов непригодны для продажи из-за нежелательного запаха.

Практически устойчивые сорта не проявляют свойственного некротического узора на плодах. Симптомы у них развиваются в виде мозаичного узора на кожице плодов, отдельных красноватых колец, дуг или пёстрой мозаичной окраски без некротических вдавленностей и заметной деформации.

К числу восприимчивых сортов относятся сорта сливы типа Венгерок, такие как Венгерка Обыкновенная, Венгерка Опошнянская, Венгерка Итальянская, Венгерка Циммера, Венгерка Молдавская, а также Монарх, Пожегача, Кюстендильская, Королева Виктория, Гигант Прюн, Пурпур Першор, Северен Кросс, Майорис Сидлинг и др.

В группу практически устойчивых сортов включены Анну Шпет, Ренклюд Зеленый, Ренклюд Фиолетовый, Венгерку Ажанскую, Раннюю Бюльскую, Стенли, Венгерку Раннюю, Ренклюд Альтана, Рекорд, Викторию, Великую Синюю, Ренклюд Волга, Венгерку ВИРа, Венгерку Бессарабскую и др.

Не поражаются сорта сливы Ундервуд, Опал, Якуб, Желтая Бутылковидная, Сколдус и т. д. Однако в последние годы наблюдается явление активного распространения PPV на практически устойчивых сортах и такой сорт как Стенли, по степени поражения необходимо переместить в группу особо восприимчивых сортов.



Рис. 7. Симптомы вируса шарки сливы на плодах персика и нектарина  
 Fig. 7 Sharka Symptoms on the fruits of peach and nectarine

#### **Характеристика и выявление вируса шарки сливы**

Возбудитель шарки относится к группе ПОТИ-вирусов и представляет собой нитеобразные частицы длиной 750-760 нм и шириной 15-20 нм, содержащие одну молекулу РНК, весом  $3,5 \times 10^6$  дальтон. Различные молекулы РНК, выделенные из PPV, были клонированы. В клетках пораженных растений возбудитель образует характерные вирусные вкрапления типа розеток, видимые в электронный микроскоп. Функционирование генома в PPV в настоящее время досконально изучено, и вирус шарки сливы является модельным для исследования молекулярной биологии ПОТИ-вирусов. Вирус имеет несколько штаммов. Один из них — хлоротический, переносится тлями, — даёт мягкие симптомы и низкую концентрацию вируса на листьях *Nicotiana clevelandii*, другой — некротический, не переносится тлями, даёт высокое содержание у *Nicotiana clevelandii* и ярко выраженные симптомы.

Общее руководство по методике отбора образцов согласно Международным стандартам фитосанитарной оценки приведено в *ISPM 27 DIAGNOSTIC PROTOCOLS DP 2: Plum pox virus* (2012). Для выявления PPV очень важен правильный отбор

образцов. Во время отбора необходимо учитывать биологию вируса и местные климатические условия, в частности погодные условия в период выращивания. Если присутствуют типичные симптомы, необходимо отбирать соцветия, листья и плоды с симптомами. На бессимптомных растениях, как минимум, образцы следует отбирать с однолетних побегов на середине каждой из основных ветвей, имеющих зрелые или полностью распутившиеся листья (выявление не надёжно на побегах одного года). Образцы следует отбирать, как минимум, из четырёх различных участков (например, четыре ветви или четыре листа) каждого растения; это критически важно в связи с неравномерным распределением PPV. Отбор образцов не должен проводиться в месяце с наиболее высокими температурами. Результаты анализов образцов, собранных осенью, менее достоверны, чем анализы образцов, отобранных ранней весной. Растительный материал желательно собирать с внутренних частей коры дерева. В весенний сезон в качестве образцов могут быть использованы цветки, молодые побеги с полностью распутившимися листьями или плоды. Летом и осенью для проведения анализа могут быть использованы зрелые листья и кожица спелых плодов, отбираемых в саду или на упаковочном предприятии. Цветки, листья, побеги и кожицу плодов можно хранить при температуре 4°C в течение не более 10 дней перед тестированием. Плоды могут храниться при температуре 4°C в течение месяца перед тестированием. Зимой можно отбирать спящие почки или кусочки коры с базальной части побегов, веточек или веток, или целые участки отростков.

Выявление PPV может проводиться с использованием биологических, серологических или молекулярных тестов, идентификация требует серологического или молекулярного тестирования. Серологическое или молекулярное тестирование – это минимальные требования для выявления и идентификации PPV (например, во время стандартной диагностики вредного организма в странах с его широким распространением). Однако, если Национальной организации по карантину и защите растений (НОКЗР) будет необходимо дополнительное подтверждение достоверности PPV (например, выявление в зоне, где вирус не встречается, или выявление в грузе, происходящем из страны, где вредный организм считается отсутствующим), может быть проведено дополнительное тестирование. Если первоначальная идентификация проводилась молекулярным методом, дальнейшие проверки следует проводить с применением серологических методов и наоборот. В следующих тестах может быть проведена идентификация штамма выявленного изолята PPV. В любом случае в тесты должны быть включены положительные и отрицательные контроли. Рекомендуемые методики описаны в данной статье далее.

В некоторых ситуациях (так, во время стандартной диагностики вредного организма в странах с его широким распространением) можно одновременно тестировать несколько растений с использованием смеси образцов от различных растений. Решение о проведении тестирования одного или нескольких растений зависит от концентрации вируса в растениях и уровня достоверности, требуемого НОЗКР.

В представленном диагностическом протоколе методы (в том числе ссылки на названия торговых марок) описаны так, как они опубликованы, поскольку по ним определяется первоначальный уровень чувствительности, специфичности и/или достигнутой воспроизводимости. Представленные в протоколах лабораторные процедуры могут быть адаптированы к стандартам отдельных лабораторий, при условии, что они надлежащим образом прошли процедуру валидации.

**Выявление PPV при помощи биологических методов.** Основными растениями-индикаторами, используемыми для выявления PPV, являются сеянцы *P. cerasifera* cv. GF31, *P. persica* cv. GF305, *P. persica* x *P. davidiana* cv. Nemaguard или

*P. tomentosa*. На рисунке 8 представлены симптомы PPV на листьях и плодах *P. tomentosa*. Растения-индикаторы выращивают из семян, высаживаемых в почвенную смесь с хорошим дренажом и держат в непроницаемой для насекомых теплице при температуре от 18 °С до 25°С до тех пор, пока они не станут пригодны для прививки (обычно 25-30 см высотой и 3-4 мм в диаметре).



Рис. 8. Симптомы вируса шарки на древесном индикаторе *P. tomentosa*  
Fig. 8 Symptoms of sharka on indicator tree *P. tomentosa*

В качестве альтернативы могут быть привиты сеянцы других видов *Prunus* с индикаторами-отростками растений. Растения-индикаторы должны быть инокулированы прививкой по общепринятым методам, например окулировкой [27] с использованием, как минимум, четырех повторностей для каждого растения-индикатора. В процессе инокуляции растения-индикаторы держат в тех же условиях и на протяжении 3 недель подрезают на несколько сантиметров выше места прививки [28]. Привитые растения следует досматривать на симптомы в течение, как минимум, 6 недель. Симптомы, в частности хлоротические полосы и рисунок, можно наблюдать на отросших побегах через 3-4 недели, и их необходимо сравнивать с положительными и здоровыми контрольными образцами. Иллюстрации симптомов, вызванных PPV на растениях-индикаторах, можно найти в ряде научных трудов [21, 22, 28].

Весной и летом проводят прививки зеленым черенком. Для этого с опытного растения срезают верхушку побега (привой) бритвой, удаляют листья и делают косой срез. На подвое удаляют верхушку, накладывают привой. Место соединения обвязывают хлопчатобумажной тканью и одевают на привой пробирку для сохранения влаги и стерильности привоя. Весной и летом симптомы проявляются на персиках на 17-21-й день, на абрикосах – на 10-й день, на сливах – на 30-50-й день, при прививках зеленым черенком – в течение одного месяца, а при осенних прививках – за 7-9 месяцев. На листьях сеянцев слив появляются светло-зеленые пятна, на сеянцах абрикоса – светло-зеленые кольца и желтые полосы вдоль жилок, деформация листовой пластинки. На листьях персика – светло-зеленые пятна и посветление боковых жилок, искривления серповидного вида листовой пластинки.

Количественные данные о специфичности, чувствительности или надежности прививки не опубликованы. Данный метод широко применяется в системах сертификации и считается точным методом выявления. С учётом продолжительности теста (для развития симптомов нужно несколько недель после инокуляции), он может

использоваться только для тестирования черенков; для проведения теста нужны специальные помещения, такие как тепличные пространства с контролем температуры, а симптомы можно спутать с симптомами присутствия других вредных организмов, передающихся прививкой. Кроме того, имеются бессимптомные штаммы, не вызывающие симптомов и не обнаруживаемые на растениях-индикаторах.

Наряду с представителями рода *Prunus*, используют травянистые растения-индикаторы: *Chenopodium foetidum*, *Chenopodium quinoa*, *Cucumis sativus* 'Delikatess', *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana benthamiana*. Эти растения дают яркие симптомы поражения вирусом шарки сливы. Растения-индикаторы нужны для предварительной диагностики и изучения биологических свойств вирусов. В результате проведенных исследований на растениях-индикаторах, инокулированных соком из органов и тканей персика, абрикоса, алычи и сливы с явно выраженными симптомами поражения вирусом шарки, нами получена положительная реакция и отмечена специфичность в зависимости от вида растения-индикатора, что подтвердило наличие возбудителя вирусной инфекции – PPV (табл. 1).

**Выявление и идентификация с использованием серологических методов.** Для скрининга большого количества образцов рекомендуется твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

При приготовлении проб примерно 0,2-0,5 г свежего растительного материала измельчают на мелкие кусочки и помещают во вместительную пробирку или пластиковый пакет.

Образцы гомогенизируют примерно в 4-10 мл (1:20 w/v) в экстракционном буфере с применением электрического гомогенизатора тканей или ручного валика, молотка или похожего снаряжения. В состав экстракционного буфера входит фосфатный буфер (PBS) pH 7,2-7,4, содержащий 2% поливинилпирролидона и 0,2% диэтилдитиокарбамата натрия [15], или альтернативный буфер, прошедший валидацию. Растительный материал необходимо тщательно гомогенизировать и сразу же использовать.

**Непрямой твердофазный иммуноферментный анализ.** Непрямой твердофазный иммуноферментный анализ (DASI-ELISA), также называемый методом тройных антител (TAS)-ELISA, следует проводить в соответствии с методикой Cambra и др. [15], используя специальные моноклональные антитела, такие как 5B-IVIA, по инструкциям производителей.

5B-IVIA – это единственные моноклональные антитела, продемонстрировавшие способность обнаруживать все штаммы PPV с высокой степенью надёжности, специфичности и чувствительности [16]. В ринг-тесте DIAGPRO, в котором принимали участие 17 лабораторий, был использован набор из 10 образцов (зараженных PPV-D, PPV-M, PPV-D+M и здоровых) из Франции и Испании. DASI-ELISA с применением моноклональных антител 5B-IVIA оказался точным на 95% (количество истинно отрицательных и истинно положительных результатов от общего количества проверенных образцов). Точность данного метода была выше, чем при применении метода иммуноспецифичной обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (IC-RT-PCR) с точностью 82% и метода транскрипции-полимеразной цепной реакции с общей амплификацией (Co-RT-PCR) с точностью 94% [18, 39]. Соотношение истинно отрицательных результатов (число полученных истинно отрицательных результатов от общего количества тестируемых здоровых растений), выявленных в тесте DASI-ELISA с использованием моноклональных антител 5B-IVIA, составило 99,0% по сравнению с методами RT-PCR в режиме реального времени с использованием очищенных нуклеиновых кислот (89,2%), отпечатка тканей (98,0%) или иммуноспецифичной RT-PCR (96,1%).

Таблица 1

Идентификация *Plum pox potyvirus* у косточковых плодовых культур с применением биотеста на растениях-индикаторах

Table 1

Identification of *Plum pox potyvirus* at stone fruits by biotest using on indicator plants

Изоляты (культура, сорт)	Симптомы проявления вирусной инфекции <i>Plum pox potyvirus</i> на растениях-индикаторах				
	<i>Chenopodium foetidum</i>	<i>Chenopodium quinoa</i>	<i>Cucumis sativus</i> 'Delikatess'	<i>Nicotiana clevelandii</i>	<i>Nicotiana glutinosa</i>
5 сорто-образцов алычи	Желтовато-охровые некротические пятна по периферии на инокулированных и отросших листьях	Желтые некротические пятна, посветеления жилок на инокулированных листьях	Хлоротические пятна на инокулированных листьях, переходящие в некрозы	Хлоротические и точечные некротические пятна на инокулированных и отросших листьях, деформация листовой пластинки	Хлоротические пятна на инокулированных листьях, точечные некротические пятна на отросших листьях
40 сорто-образцов персика	Желтовато-охровые некротические пятна по периферии на инокулированных листьях и некротические пятна на отросших листьях	Точечные некротические пятна на инокулированных листьях	Локальные хлоротические и некротические пятна на семядолях, отмирание семядолей	Мозаичный узор и точечные некротические пятна на инокулированных листьях	Хлоротические пятна, точечные некротические пятна на инокулированных листьях
20 сорто-образцов нектарина	Сначала хлоротические кольцевые пятна на инокулированных листьях, затем некротическая пятнистость по периферии листа, листья асимметричные	Точечные некротические пятна на инокулированных листьях	Округлые хлоротические пятна на инокулированных листьях, переходящие в некрозы	Хлоротические пятна на инокулированных листьях, переходящие в некрозы, деформация листьев	Точечный некроз тканей листа
3 сорто-образца сливы	Сначала желтые, затем некротические пятна на инокулированных листьях, хлороз жилок	Хлоротические пятна на инокулированных листьях	Системная мозаика (симптомы на инокулированных семядолях и отросших листьях)	Мозаика и деформация отросших листьев	Хлоротические пятна на инокулированных листьях, точечные некротические пятна на отросших листьях

**Твердофазный иммуноферментный анализ.** Обычные или биотин / стрептавидиновые системы DASI-ELISA следует применять с использованием наборов на основе специфичных моноклональных антител 5B-IVIA или поликлональных антител, для которых установлена способность выявлять все штаммы PPV без перекрестной реакции с остальными вирусами и здоровым растительным материалом. Тестирование следует проводить в соответствии с инструкциями производителя.

В то время как моноклональные антитела 5B-IVIA выявляют с высокой степенью точности, чувствительности и надёжности все штаммы PPV, некоторые поликлональные антитела недостаточно специфичны и обладают ограниченной чувствительностью. Поэтому рекомендуется использовать дополнительные методы в случаях, когда применялись поликлональные антитела и НОКЗР требует дополнительного подтверждения идентификации PPV.

**Применение набора реагентов для иммуноферментного определения вируса шарки сливы (ИммуноФА-PPV-ПФ-М).** Назначение. Набор «ИммуноФА-PPV-ПФ-М» («НВО Иммунотех», Россия), или система «Пиротест», предназначен для качественного определения вируса шарки сливы в экстракте из листьев косточковых культур методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Набор рассчитан на проведение анализа 43 неизвестных образцов экстрактов, 1 образца положительного контроля, 4 образцов отрицательных контролей, в дубликатах, всего 96 определений.

Принцип работы набора. Принцип метода определения основывается на специфическом взаимодействии вируса, содержащегося в экстракте, с антигенами к вирусу, иммобилизованными на твердой фазе. Для выявления связанного вируса используют пирофосфатазный конъюгат поликлональных антител к вирусу. Количество связанного конъюгата выявляют при помощи субстрата пирофосфата натрия. После добавления стоп-реагента образцы, содержащие вирус, и положительный контроль окрашиваются в зелено-синий цвет. Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству вируса, содержащегося в анализируемом образце. В отрицательном контроле и в образцах, не содержащих вируса, наблюдается желтое окрашивание. Изменение оптической плотности регистрируют визуально или фотометрически при длине волны 620 нм или 630 нм.

Состав набора:

- планшет 96-луночный полистирольный, с крышкой – 1 шт.;
- антитела для сорбции на планшете, концентрированные – 1 пробирка (40 мкл);
- буферный раствор для нанесения антител – 1 фл. (10 мл);
- положительный контроль на основе экстракта из листьев с высоким содержанием PPV, лиофильно высушенный – 1 фл.;
- отрицательный контроль на основе экстрактов из листьев алычи, абрикоса, персика и сливы, не содержащих вируса, лиофильно высушенный – 4 фл.;
- буферный раствор для промывки планшета (далее – «промывочный буфер»), концентрированный (10х) – 1 фл. (35 мл);
- буферный раствор для экстракции вируса («экстрагирующий буфер»), концентрированный (5х) – 1 фл. (40 мл);
- конъюгат кроличьих антител к PPV с неорганической пирофосфатазой («конъюгат»), концентрированный – 1 пробирка (40 мкл);
- ёмкость для приготовления рабочего раствора конъюгата;
- субстратный буферный раствор – 1 фл. (12 мл);
- субстрат – пирофосфат натрия – 1 пробирка (200 мкл);
- стоп-реагент, готовый к использованию – 1 фл. (11 мл).

Меры безопасности. Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента, в используемых концентрациях не токсичны. Стоп-реагент действует на кожу и слизистые прижигающим образом, вызывая раздражения и ожоги, поэтому при попадании на кожные и слизистые покровы его следует немедленно смыть большим количеством проточной воды.

Оборудование и реагенты:

- гомогенизатор для измельчения растительных тканей;

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 620-630 нм;
- термостат суховоздушный или шейкер термостатируемый, поддерживающие температуру  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ;
- центрифуга, обеспечивающая вращение со скоростью 5-10 тыс. об/мин.;
- пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема с соответствующими сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 20-200 мкл и 200-1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная переменного объема со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости 50-250 мкл;
- бумага фильтровальная;
- стаканы мерные химические или колбы мерные емкостью 300-500 мл;
- вода дистиллированная;
- холодильник с морозильной камерой, поддерживающей температуру не выше ( $18-20^\circ\text{C}$ ).

Приготовление реагентов. Сорбция антител на планшете. Открыть упаковку планшета и вынуть планшет с крышкой. Перенести содержимое пробирки с антителами во флакон с буферным раствором для сорбции антител. Промыть пробирку трижды полученным раствором, объединив промывочные воды. Внести во все лунки планшета по 100 мл полученного раствора. Закрыть планшет крышкой и инкубировать при температуре ( $2-8^\circ\text{C}$ ) в холодильнике в течение ночи.

**Примечание.** Остальные реагенты готовят на следующий день.

Приготовление рабочего раствора промывочного буфера. Содержимое флакона с концентратом буферного раствора перенести в **химически чистую** ёмкость вместимостью 500 мл, трижды ополоснуть флакон дистиллированной водой, все промывочные воды объединить с разбавленным буфером и довести общий объем раствора до 350 мл дистиллированной водой. Рабочий раствор можно хранить в закрытой ёмкости при температуре ( $2-8^\circ\text{C}$ ) не более 5 дней.

Приготовление рабочего раствора экстрагирующего буфера. Содержимое флакона с концентратом экстрагирующего буфера перенести в ёмкость вместимостью 300 – 500 мл, трижды тщательно промыть флакон дистиллированной водой, все промывочные воды объединить с разбавленным буфером и довести общий объем раствора до 200 мл дистиллированной водой. Рабочий раствор можно хранить в закрытой ёмкости при температуре ( $2-8^\circ\text{C}$ ) не более 5 дней.

Приготовление положительного контроля. В содержимое флакона с положительным контролем добавить 1 мл дистиллированной воды. Неиспользованный остаток положительного контроля можно хранить замороженным при  $20^\circ\text{C}$ . Допускается только однократное замораживание и размораживание разбавленного образца положительного контроля.

Приготовление отрицательного контроля. В содержимое флакона с отрицательным контролем добавить 1 мл дистиллированной воды.

Неиспользованный остаток хранить при  $+4^\circ\text{C}$  в течение ночи или замороженным при  $-20^\circ\text{C}$ . Допускается только однократное замораживание и размораживание разбавленных образцов отрицательного контроля.

Приготовление рабочего раствора конъюгата. Содержимое пробирки растворить в 10 мл рабочего раствора промывочного буфера (п. 6.1), используя для этого соответствующую пустую ёмкость. Промыть пробирку трижды полученным раствором и объединить промывочные воды. Рабочий раствор конъюгата готовят непосредственно перед использованием, хранению не подлежит.

Приготовление рабочего раствора субстрата. Во флакон с субстратным буферным раствором добавить 200 мкл субстрата, тщательно перемешать. Готовят непосредственно перед использованием, хранению не подлежит.

Проведение анализа. Навеску листьев (0,2 г листовой ткани) гомогенизировать в 4 мл экстрагирующего буфера (готовят в соответствии с п. 6.2). Экстракт осветлить центрифугированием (5-10 тыс. об/мин., 3-5 мин).

**Примечание.** Для анализа следует использовать листья без признаков грибных или бактериальных инфекций. Лучше всего использовать свежие, полностью распустившиеся листья. Можно использовать листья, хранившиеся замороженными при температуре не выше  $-20^{\circ}\text{C}$ , при условии правильного сбора и хранения в плотно закрытом пакете, без обезвоживания и размораживания.

Вынуть планшет из холодильника и опустошить его, вытряхнув содержимое лунок в раковину.

Промыть планшет промывочным буфером 5 раз, добавляя каждый раз в лунки по 200 мкл раствора и выдерживая 1-2 мин с каждой сменой буфера. После окончания промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок, несколько раз промокнув планшет фильтровальной бумагой.

**Примечание.** Ванночка для промывочного буфера (при использовании многоканальной пипетки) должна быть **химически чистой**.

Внести в лунки по 100 мкл осветленного экстракта. Для каждого образца следует использовать отдельный сменный наконечник. В отдельные лунки внести по 100 мкл положительного контроля и по 100 мкл отрицательного контроля (от 1 до 4 образцов, в зависимости от вида растений, в которых проводится определение вируса).

Закрыть планшет крышкой и инкубировать 1 ч при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$ .

**Примечание.** Из-за высокой вязкости экстрактов из листьев косточковых культур инкубация на термостатируемом шейкере (300 – 450 об/мин.) позволяет получать более надёжные результаты.

Опустошить планшет, вытряхнув содержимое из лунок в раковину, и промыть его.

**Примечание.** Убедитесь, что на дне и стенках лунок отсутствуют какие-либо признаки растительных экстрактов. При необходимости промойте планшет еще раз.

Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата. Закрыть планшет крышкой и инкубировать 1 ч при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$ . Опустошить планшет, вытряхнув содержимое из лунок в раковину, и промыть его. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора субстрата. Закрыть планшет крышкой и инкубировать 25 мин при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$ . Не опустошая та не промывая планшет, добавить в каждую лунку с рабочим раствором субстрата по 100 мкл стоп-реагента и тщательно перемешать содержимое лунок на шейкере при комнатной температуре в течение 1 мин. инкубировать планшет при комнатной температуре в течение 10 мин, наблюдая за развитием окрашивания. Результат реакции оценивать визуально или фотометрически (рис. 9). Измерять оптическую плотность в лунках планшета на спектрофотометре вертикального сканирования при длине волны 620-630 нм.

**Примечание.** Допускается оценивать результат анализа на протяжении более длительного времени (1-2 ч) после внесения стоп-реагента, выдерживая планшет при комнатной температуре. Продолжение времени инкубации со стоп-реагентом обычно способствует повышению чувствительности анализа и выявлению положительных образцов с низкой концентрацией вируса. При этом содержимое лунок с отрицательными контролями должно окрашиваться в желтый цвет в течение всего времени наблюдения за развитием реакции. После появления признаков зеленого окрашивания в образцах отрицательного контроля наблюдение следует прекратить.

Оценка результатов анализа. Величина оптической плотности положительного контроля должна быть не менее 0,8 ед. опт. плот. через 10 мин инкубации со стоп-реагентом. Величина оптической плотности любого отрицательного контроля не должна превышать 0,05 ед. опт. плот. через 10 мин инкубации со стоп-реагентом. Положительными, то есть содержащими вирус, считаются образцы, средняя арифметическая величина оптической плотности которых в 3 и более раз превышает

значение оптической плотности в отрицательном контроле соответствующей косточковой культуры. Данный критерий оценки положительных образцов применяется и при более длительной инкубации со стоп-реагентом при условии, что величина оптической плотности в отрицательных контролях не превышает 0,1 ед. опт. плот.

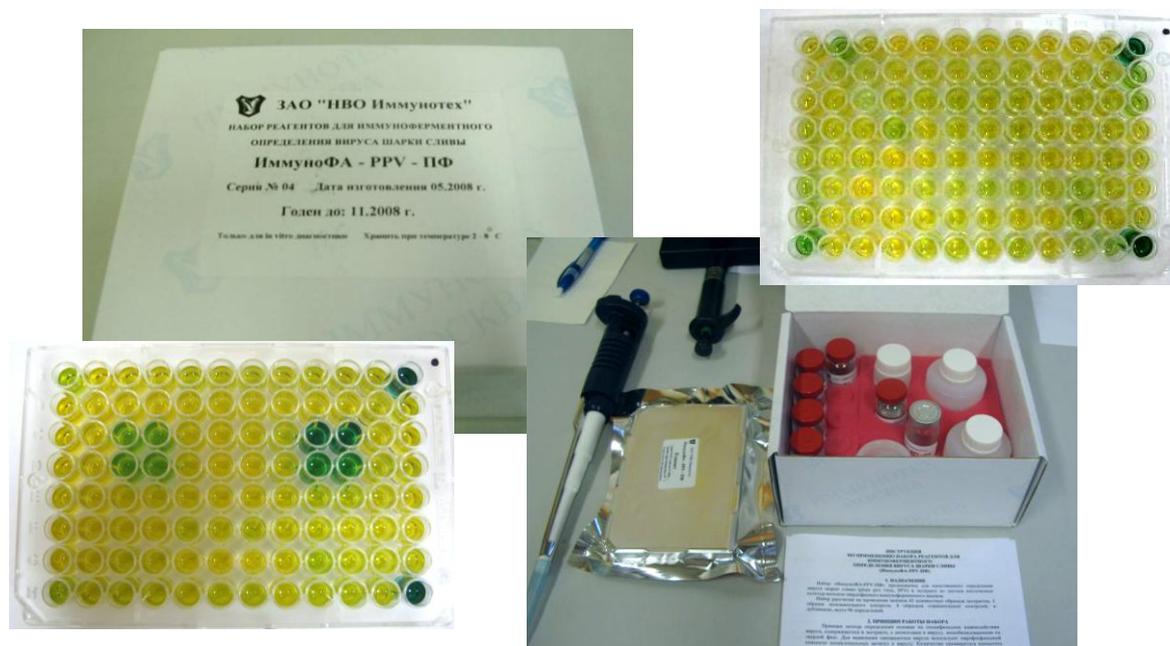
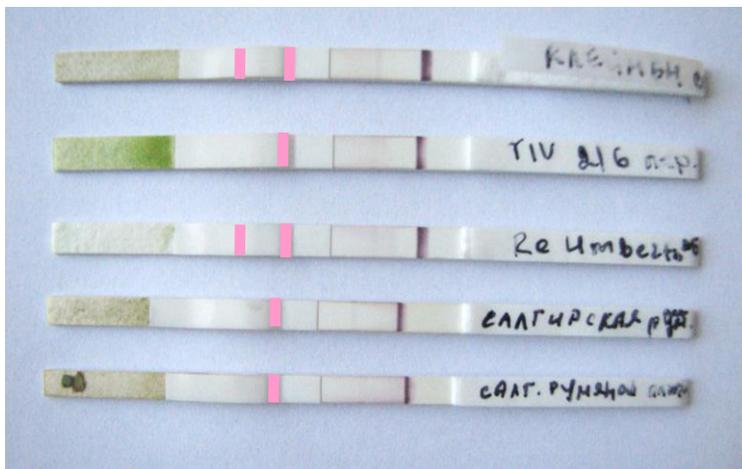


Рис. 9. Система «Пиротест-ИФА» для выявления положительной реакции на присутствие РРV  
Fig. 9 “Pirotest-IFA” system for detection a positive reaction to PPV

**Использование других наборов для ИФА.** Для детектирования вируса шарки сливы можно применять наборы ELISA Reagent set (кат. № 31505, «Agdia», США), обнаруживающие все известные штаммы вируса, по протоколу изготовителя. На планшеты MaxiSorp («Nunc», Дания) наносят антитела к РРV, растворённые 1:200 в карбонатно-бикарбонатном буфере, pH 9.6, и их инкубируют на протяжении ночи при +4°C. Планшеты промывают PBS, содержащим 0,1% Твин-20, 5 раз и вносят в лунки экстракты, приготовленные путём растирания листовой ткани в экстрагирующем буфере (PBS, 2% поливинилпирролидон («Sigma», США), 0,5% Тритон X-100, 0.1% Твин 20) в соотношении 1:20 (г/мл). Инкубируют 2 ч при 37 °С на термостатируемом шейкере Shaker ST-3 («ELM», Латвия). Планшеты промывают, как описано, и вносят конъюгат, разбавленный 1:200 буфером, входящий в состав набора. Инкубируют 1 ч на термостатируемом шейкере, промывают и вносят в лунки субстрат (1 мг/мл п-нитрофенилфосфат у 10% диэтаноламина, pH 9.8). Оптическую плотность продукта ферментативной реакции оценивают через 20 мин инкубации при 37°C на считывающем устройстве Titertek Multiscan (Eflab, Финляндия) при длине волны 405 нм. Положительной считают реакцию, в которой сигнал в лунке с анализируемым раствором в три раза превышает среднее арифметическое сигналов в отрицательных контролях.

**Диагностика вируса шарки сливы при помощи ИХА.** В настоящее время для диагностики вируса шарки сливы используют метод иммунохроматографии (ИХА) в пористых мембранах (тест-полосках). Анализ растительных экстрактов при помощи тест-полосок занимает несколько минут (рис. 10). Простота метода позволяет применять его во внелабораторных, в том числе полевых, условиях (без специальной

подготовки персонала). По эффективности выявления зараженных вирусами растений ИХА практически не уступает методу иммуноферментного анализа (ИФА) [23, 33, 40, 41]. Важным показателем надежности диагностических тест-систем ИХА является включение данного метода в диагностические протоколы Европейской организации по защите растений для определения ряда карантинных вирусов [25, 26].



**Рис. 10.** Определение вируса PPV в экстрактах из листьев сливы 'Клеймен', персика 'Бархатистый', абрикоса 'Re Umberto' и алычи 'Салгирская Румяная' методом ИХА  
**Fig. 10** PPV determination in extracts from the leaves of plum 'Kleyman', peach 'Barhatistiy', apricot 'Re Umberto' and cherry plum 'Salgirskaya Rumjanaya' by immunoassay analysis

На кафедре вирусологии МГУ им. М.В. Ломоносова были разработаны тест-полоски для экспресс-диагностики PPV на основе моноклональных антител к вирусу шарки сливы и частиц коллоидного золота в качестве маркера. Моноклональные антитела, используемые для конструирования тест-полосок, были получены российскими исследователями после иммунизации животных очищенным препаратом вируса шарки сливы, относящемся к штамму D. К тому же было выяснено, что данные тест-полоски также обнаруживают другие, антигенно отличные, штаммы вируса [13].

ИХА проводят при помощи тест-полосок. Фрагмент свежего листа массой 150-200 мг помещают в полиэтиленовый пакет размером 10x10 см и добавляют 3-4 мл экстрагирующего буфера. Листья разминают на твердой поверхности на протяжении 1 мин, 0.3-0.4 мл экстракта сливают в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и погружают в неё тест-полоску на 10 мин. Затем полоски вынимают, проводят оценку визуально, получают их цифровое изображение на сканере HP ScanJet 5300C и рассчитывают яркость аналитической зоны с использованием программы TotalLab [1].

#### **Идентификация штаммов PPV с использованием молекулярных методов.**

**Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.** Штаммы PPV-D и PPV-M идентифицируются с использованием праймеров, описанных Olmos и др. [38]:

P1 (5'-ACC GAC ACC ACT CTC CC-3')

PD (5'-CTT CAA CGA CCG TAC GC-3')

PM (5'-CTT CAA CGC CTG GT-3')

25 мкл реакционной смеси имеет следующий состав: 1 мкм праймера P1, 1 мкм праймеров PD или PM, 250 мкм dNTPs, 1 единица обратной транскриптазы AMV (10 единиц/мкл<sup>-1</sup>), 0.5 единицы ДНК Taq полимеразы (5 единиц/мкл<sup>-1</sup>), 2.5 мкл 10 х буфера для Taq полимеразы, 1.5 мМоль MgCl<sub>2</sub>, 0.3% Тритона X-100, 2% формамида и 5 мкл образца РНК. RT-PCR проводится в следующих термоциклических условиях: 45 мин при 42°C, 2 мин при 94°C, 40 циклов по 30 сек при 94°C, 30 сек при 60°C и 1 мин при 72°C с дальнейшим удержанием в течение 10 мин при температуре 72°C. Результаты

PCR анализируются при помощи гель-электрофореза. Праймеры P1/PD и P1/PM образуют ампликон 198bp. Метод был испытан с использованием шести изолятов PPV-D и четырёх изолятов PPV-M.

Штамм PPV-Rec идентифицируется с использованием праймеров mD5/mM3, специфичных к штамму PPV-Rec и описанных Šubr, Pittnerova и Glasa [43]:

mD5 (5'-TAT GTC ACA TAA AGG CGT TCT C-3')

mM3 (5'-CAT TTC CAT AAA CTC CAA AAG AC-3').

25 мкл реакционной смеси имеет следующий состав (в модификации Šubr, Pittnerova и Glasa [43]): по 1 мкМ каждого праймера, 250 мкМ dNTPs, 1 единица обратной транскриптазы AMV (10 единиц/мкл<sup>-1</sup>), 0.5 единицы ДНК Taq полимеразы (5 единиц/мкл<sup>-1</sup>), 2.5 мкл 10 х буфера для Taq полимеразы, 2.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, Тритон X-100 и 5 мкл выделенной РНК.

Продукт PCR размером 605 bp анализируется при помощи гель-электрофореза.

**Метод иммуноспецифичной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.** Реакционная смесь для PCR добавляется непосредственно в покрытые антителами пробирки PCR. Идентификация штаммов PPV-D и PPV-M проводится в соответствии с описанием в разделе 3.4.1.

**Метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией с общей амплификацией.** Для идентификации штаммов PPV-D и PPV-M используют зонды, меченные 3'DIG, специфичные к штаммам D и M [37]:

Зонд, специфичный к штамму PPV-D 5'-CTT CAA CGA CAC CCG TAC GGG CA-DIG-3'; специфичный к штамму PPV-M 5'-AAC GCC TGT GCG TGC ACG T-DIG-3'. Этапы прегибридизации и гибридизации проводятся при 50°C со стандартными буферами для прегибридизации та гибридизации + 30% формамид (для выявления штамма PPV-D) и + 50% формамид (для идентификации штамма PPV-M). Используется 2% блокирующий раствор (масса/объём).

**Метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени.** Штаммы PPV-D и PPV-M специфично идентифицируются с использованием красителя SYBR Green I согласно методике Varga и James [45] или методике с красителем TaqMan, описанной Capote и др. [20].

В методе Capote и др. [20] используются следующие праймеры и зонды TaqMan:

PPV-MGB-F праймер (5'-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3')

PPV-MGB-R праймер (5'-CAC AAT GCT GCT GCC TTC AT-3')

MGB-D зонд (5'-FAM-TTC AAC GAC ACC CGT A-MGB-3')

MGB-M зонд (5'-FAM-TTC AAC AAC GCC TGT G-MGB-3').

25 мкл реакционной смеси имеет следующий состав: 1 мкМ каждого праймера, 150 нМ FAM зонда MGB-D или MGB-M, 1 х TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems), 1 х MultiScribe и RNase Inhibitor Mix (Applied Biosystems) и 5 мкл образцов РНК3. RT-PCR проводится в следующих термоциклических условиях: 30 мин при 48°C, 10 мин при 95°C, 40 циклов по 15 с при 95°C, 60 с при 60°C. Результаты PCR анализируются в режиме реального времени в соответствии с инструкциями изготовителей. Метод был апробирован с использованием 12 изолятов PPV-D и PPV-M, а также 14 образцов, зараженных обоими штаммами одновременно.

Штаммы PPV-C, PPV-EA и PPV-W специфично идентифицируются с использованием красителя SYBR Green I согласно методу Varga и James [46]:

P1 (5'-AAC GAC ACC ACT ACA CTC CC-3')

PPV-U (5'-TGA AGG CAG CAG CAT TGA GA-3')

PPV-RR (5'-CTC TTC TTG TGT TCC GAC GTT TC-3').

Для обеспечения правильности проведения анализа рекомендуется использовать следующие праймеры внутреннего контроля:

Nad5-F (5'-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3')

Nad5-R (5'-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3').

25 мкл разбавленной смеси для RT-PCR имеет следующий состав: 2.5 мкл 1:10 (объем/объем) разбавленной в воде выделенной РНК и 22.5 мкл рабочей смеси. Рабочая смесь состоит из следующих компонентов: 2.5 мкл буфера Karsai [30] по 0.5 мкл с 5 мкМ праймеров PPV-U, PPV-RR или P1, Nad5R и Nad5F; 0.5 мкл с 10 мМ dNTPs; 1 мкл и 50 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0.2 мкл RNaseOUT™ (40 единиц/мкл<sup>-1</sup>; Introgen); 0.1 мкл Superscript™ III (200 единиц/мкл<sup>-1</sup>; Introgen); 0.1 мкл Platinum® Taq DNA полимеразы с высокой точностью (5 единиц/мкл<sup>-1</sup>; Introgen) и 1 мкл SYBR Green 1 (Sigma) в 16.1 мкл воды. Реакция протекает в следующих термоциклических условиях: 10 мин при 50°C, 2 мин при 95°C, 29 циклов по 15 сек при 95°C и 60 сек при 60°C. Анализ кривой плавления проводится путём удержания при температуре от 60°C до 95°C с шагом 0.1 °C c<sup>-1</sup> с усреднённым показателем сглаживания кривой, равным 1 единице. Температуры плавления для каждого продукта реакции следующие:

Штамм *C* (фрагмент 74bp): 79.84°C

Штамм *EA* (фрагмент 74bp): 81.27°C

Штамм *W* (фрагмент 74bp): 80.68°C

Данный метод был апробирован с использованием изолятов PPV-*C*, PPV-*D*, PPV-*EA* и PPV-*W*.

**Примечание:** Использование бренда Applied Biosystems для TaqMan Universal PCR Master Mix и MultiScribe и RNase Inhibitor Mix, а также бренда Invitrogen для RNaseOUT™, Superscript™ II и Platinum® Taq полимеразы ДНК с высокой точностью в данном диагностическом протоколе не предусматривает предоставления им предпочтения и исключение других, которые также могут применяться. Данная информация приводится для удобства пользователей этого протокола. Эквивалентные продукты могут быть использованы, если они дают те же результаты.

Проведенный анализ на выявление зараженности PPV в собранных в Крыму образцов методами ИФА и ИС-ОТ-ПЦР показал наличие вируса шарки сливы в 15 образцах (табл. 2) в коллекционных насаждениях косточковых плодовых культур в НБС-ННЦ. 14 изолятов относились к штамму *D*, 1 – к штамму *Rec*. Следует отметить, что данный изолят *Rec* впервые обнаружен на территории Крыма и на постсоветском пространстве в целом. Размеры ПЦР-продуктов, полученных с использованием универсальных и *D*-специфичных праймеров (220 и 198 пн соответственно), согласовывались с ожидаемыми. Штаммы *M*, *C*, *CR* и *W* не были обнаружены (данные ИС-ОТ-ПЦР с результатами анализа на данные штаммы не приведены).

Таким образом, из 15 изолятов PPV, обнаруженных в насаждениях косточковых культур на территории НБС-ННЦ, 14 относились к штамму *D*. Штамм *D* является наиболее распространенным штаммом вируса шарки сливы и, в отличие от других, распространен во всём мире. Он преобладает в Европе, выявлен в Азии, Африке, Северной и Южной Америке. В этой работе данный штамм впервые обнаружен также и в Крыму. Вместе с тем известно, что наиболее частыми хозяевами PPV штамма *D* являются слива и алыча. Изоляты, выявленные на персике, обычно относятся к штамму *M*. В данной работе большинство изолятов штамма *D* были выявлены на персике. Секвенирование полных геномов изолятов, относящихся к штамму *D*, показывает низкий уровень их генетической изменчивости. Вполне вероятно, что изоляты штамма *D*, выявленные в Крыму на персике, отличаются от известных и, возможно, представляют уникальную, обособленную группу в пределах этого штамма. Для выяснения данного вопроса требуется дальнейшая работа по секвенированию выявленных на персике вирусных изолятов.

На рисунке 11 а-г представлены результаты определения PPV в исследуемых образцах и типирования штамма.

Таблица 2

Результаты диагностики и идентификации PPV в растительных образцах из Крыма

Table 2

The results of PPV diagnostics and identification in Crimea plant samples

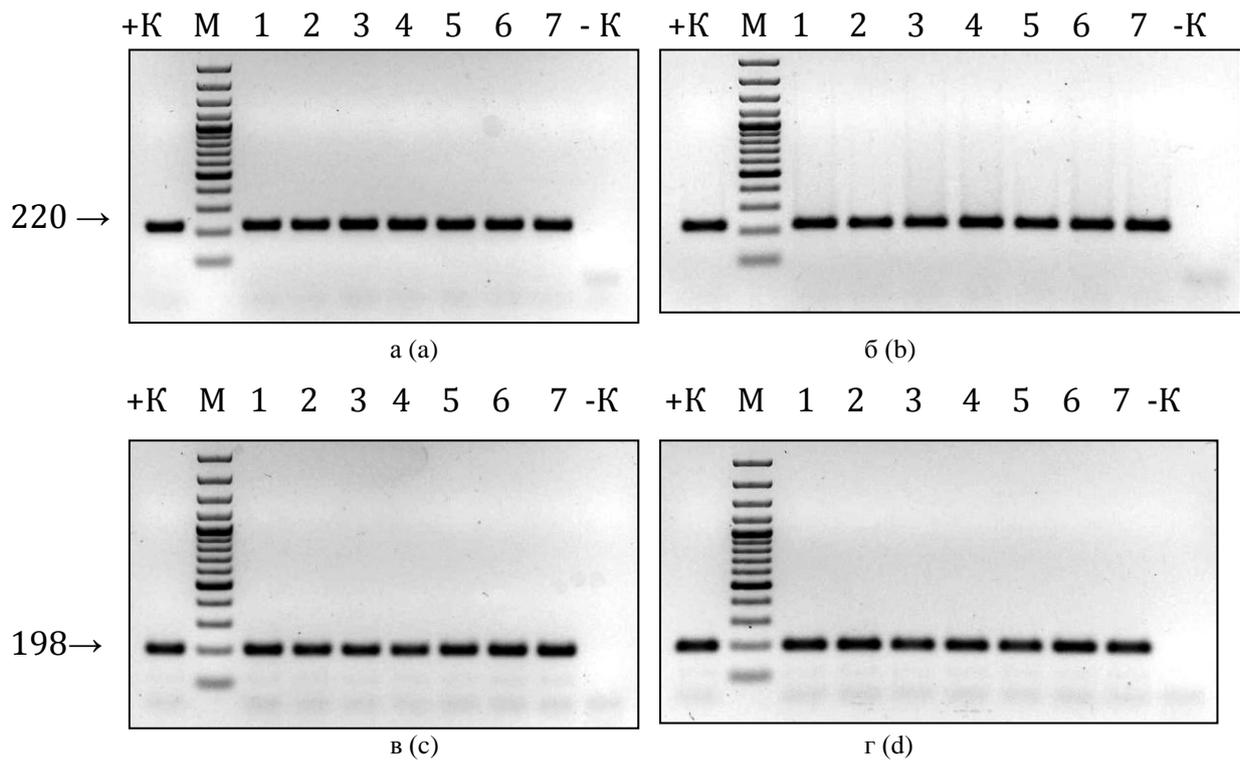
№	Растение-хозяин (вид, сорт)	Оптическая плотность продукта ИФА (А 405)	Наличие зоны 220 пн в ОТ- ПЦР	Штамм PPV
1	<i>Prunus persica</i> Золотая Москва	2,576	+	D
2	<i>P. persica</i> Слава Стевена	1,834	+	D
3	<i>P. persica</i> Мирянин х Невеста 83-878	2,637	+	D
4	<i>P. persica</i> Тюльпан	2,910	+	D
5	<i>P. persica</i> Достойный	2,220	+	D
6	<i>P. persica</i> Санбим	1,660	+	D
7	<i>P. domestica</i> Изюм Эрик	2,457	+	D
8	Лоросль под сливой Изюм Эрик	2,457	+	D
9	<i>P. domestica</i> Клеймен	2,941	+	D
10	<i>P. cerasifera</i> Пурпурная	2,625	+	D
11	<i>P. persica var. Nectarine</i> 594-81	1,660	+	D
12	Персик гибридный	2,783	+	D
13	<i>P. persica var. Nectarine</i> May Grand	2,941	+	D
14	<i>P. persica var. nectarine</i> Flavor Gold	2,316	+	D
15	Подвой <i>P. cerasifera</i>	2, 295	+	Rec
16	Отрицательный контроль AgriTest	0,087	-	-
17	Отрицательный контроль – <i>P. persica</i> Орфей	0,097	-	-
18	Отрицательный контроль – <i>P. cerasifera</i> Пионерка	0,090	-	-

Важным результатом работы было выявление штамма *Rec* на алыче. Этот штамм представляет собой естественный рекомбинант между штаммами *D* и *M* в гене N1b, поэтому 3'-конечная часть вирусного генома (нуклеотиды 8450 – 9786) происходит от штамма *M*, а остальной геном – от штамма *D*. По этой причине изоляты, относящиеся к данному штамму, обнаруживаются в ОТ-ПЦР при помощи универсальных праймеров и праймеров, специфичных к штамму *M*. Специфичное детектирование изолятов штамма *Rec* проводится при помощи праймеров, разработанных Subg и др. [43]. На рис. 12 представлены результаты типирования изолята, выявленного на алыче, полностью отвечающие ожидаемым.

### Заключение

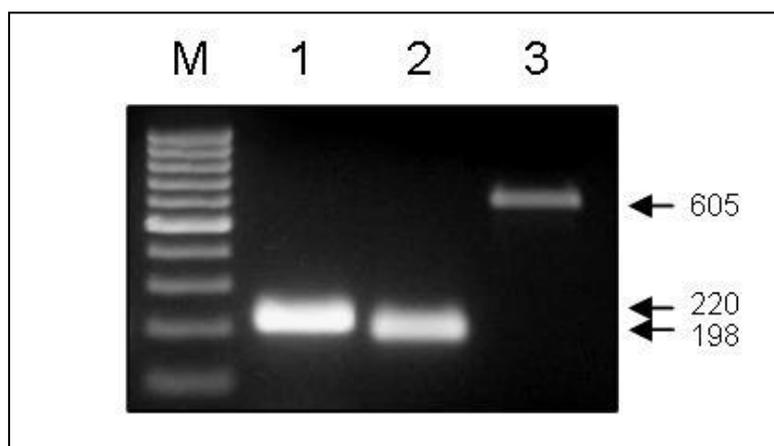
Таким образом, процедура диагностирования вируса шарки сливы и идентификации новых изолятов основывается на применении биологических, серологических и молекулярных методов анализа (рис. 13) и регламентируется диагностическим протоколом, разработанным Европейской организацией по защите растений (European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO) [18, 24]. В 2012 году на VII сессии Комиссии по фитосанитарным мерам был принят доработанный и усовершенствованный диагностический протокол [<http://www.sharco.eu/var/sharco/storage/htmlarea/3244/file/ISPM%2027%20Diagnostic%20protocols%20DP2%20PPV.pdf>]. Данная методика разработана на основании этих протоколов и разработанных нами результатах многолетних исследований.

Мониторинг распространения вируса шарки в Крыму показал, что шарка распространена в ряде районов, таких как Бахчисарайский, Севастопольский, Ялтинский, Нижнегорский, Сакский. Отдельные пораженные растения встречались нам в Симферопольском, Красногвардейском, Белогорском районах. Поэтому для радикального снижения вредоносности вируса шарки сливы необходимо внедрение



**Рис. 11** Анализ штаммового разнообразия изолятов PPV методом ИС-ОТ-ПЦР с универсальными (А, Б) и штамм-*D*-специфичными праймерами. Электрофорез в 2% агарозном геле. Нумерация образцов соответствует приведенной в Таблице 2. +К – Agritest. – К – Agritest. М – маркеры молекулярной массы продуктов ПЦР (GeneRuler Plus 100 bp DNA ladder (Fermentas)). Стрелками показано расположение специфичного продукта ПЦР: 220 пар нуклеотидов (пн) для изолятов PPV с универсальными праймерами, 198 пн для изолятов штамма *D* с соответствующими праймерами

**Fig. 11** Analysis of strain diversity of PPV isolates by IC-RT-PCR with universal (A, B) and strain-*D*-specific primers. Electrophoresis in 2% agarose gel. The numbering corresponds to the samples shown in Table 2. + К - Agritest. - К - Agritest. M - molecular weight markers of PCR products (GeneRuler Plus 100 bp DNA ladder (Fermentas)). The arrows indicate the location of a specific PCR product: 220 bp for isolates of PPV with universal primers, 198 bp for isolates of strain *D* with the appropriate primers



**Рис. 12.** Анализ изолята 15 методом ИС-ОТ-ПЦР с универсальными (1), М-специфичными (2) и Рес-специфичными (3) праймерами. М – GeneRuler 100 bp DNA ladder (Fermentas).

**Fig. 12** Analysis of isolate 15 by IC-RT-PCR with universal (1), M-specific (2) and Rec-specific (3) primers. M - GeneRuler 100 bp DNA ladder (Fermentas).

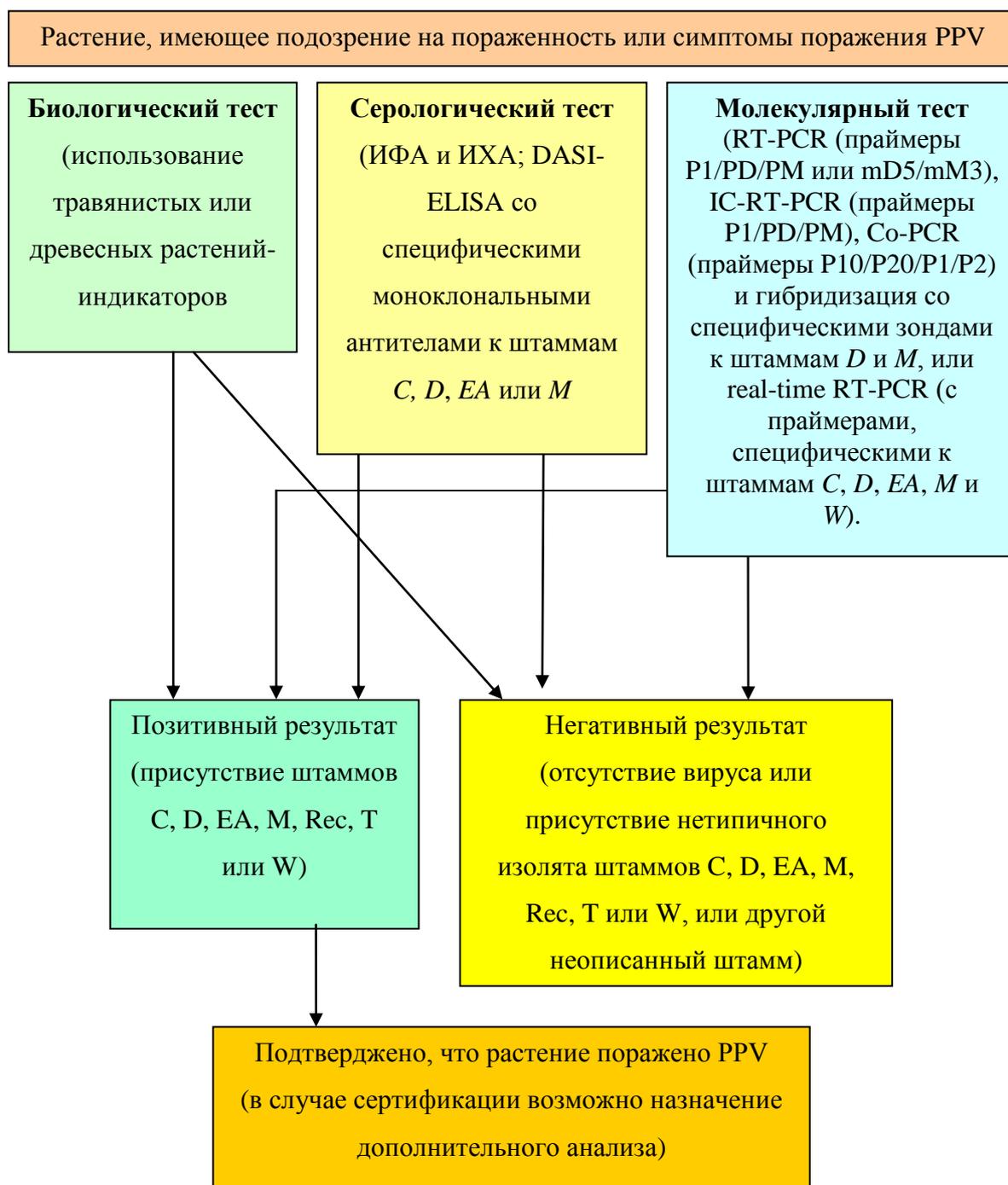


Рис. 13 Схема системы комплексного оценивания на поражаемость PPV насаждений косточковых плодовых культур

Fig. 13 Scheme of integrated assessment of susceptibility to PPV stone fruits orchards

современных биотехнологий для получения безвирусного посадочного материала косточковых плодовых культур, закладка безвирусных маточников, поиск толерантных сортов и создание методами геной инженерии устойчивых сортов персика, абрикоса, алычи и сливы.

#### Список литературы

1. Бызова Н.А., Сафенкова И.В., Чирков С.Н., Авдиенко В.Г., Гусева А.Н., Митрофанова И.В., Жердев А.В., Б.Б. Дзантиев Б.Б., Атабеков И.Г. Взаимодействие

вируса шарки сливы с антителами, конъюгированными с коллоидным золотом, и разработка иммунохроматографической системы детекции вируса // Биохимия. – 2010. – №11. – С. 1583-1595.

2. *Вредные организмы*, имеющие карантинное значение для Европы // Информационные данные по карантинным вредным организмам для Европейского союза и Европейской и Средиземноморской организации по защите растений (ЕОЗР) / Перевод с англ. – М.: Колос, 1996. – 912 с.

3. *Мартинов С., Митрофанова О., Митрофанова І.* Використання діагностичних методів для виявлення ступення ураження сортів персика вірусом шарки сливи (*Plum pox virus*) // Вісник Львівського Університету. – Серія Біологічна. – 2013. – Вип. 62. – С. 21-28.

4. *Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Ходаков Г.В.* Биотехнология в селекции и оздоровлении косточковых плодовых и субтропических культур // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова / За ред. М.В. Роїка. – Київ: Логос, 2006. – Т. 3. – С. 619-624.

5. *Митрофанова О.В., Митрофанова І.В.* Биотехнология освобождения от вирусов и клональное микроразмножение декоративных и плодовых растений // Труды Никит. ботан. сада. – 2012. – Т. 134 – С. 213-227.

6. *Митрофанова О.В., Митрофанова І.В.* Вирусы субтропических и косточковых плодовых культур и биотехнологические приемы оздоровления растений // Біоресурси та віруси: II Міжнародна конференція. – Київ, 7-10 вересня 1998 р. – Київ: Фітосоціоцентр, 1998. – С. 94.

7. *Митрофанова О.В., Митрофанова І.В., Ежов В.Н., Лесникова-Седошенко Н.П., Лукичева Л.А., Смыков А.В., Сенин В.В., Литвинова Т.В.* Изучение вирусов и вирусных болезней косточковых плодовых культур на юге Украины и особенности оздоровления растений *in vitro* // Бюл. Никит. ботан. сада. – 2005. – Вып. 91 – С. 1-12.

8. *Митрофанова О.В., Митрофанова І.В., Чирков С.Н., Ежов В.Н., Лесникова-Седошенко Н.П.* Биотехнологические системы диагностики вируса шарки сливы (*Plum pox virus*) и отбора толерантных сортов косточковых плодовых культур // Сб. науч. труд. Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 94-103.

9. *Митрофанова О.В., Славгородская-Куртеева Л.Е., Митрофанова І.В., Лукичева Л.А.* Диагностика вирусных болезней и биотехнологические приемы получения безвирусного посадочного материала косточковых плодовых культур. – Ялта: Крымпресс. – 2000. – 45 с.

10. *Омельюта В.П., Устїнова А.Ф., Устїнов І.Д.* Карантинні об'єкти // Захист рослин. – 1997. – № 3. – С.4-5.

11. *Пискун Н.И.* «Шарка» слив на Украине // Защита растений. – 1969. – № 6. – С. 54.

12. *Ратушняк Л.К.* Розповсюдженість шарки сливи в Україні // Вісник аграрної науки південного регіону. Сільськогосподарські та біологічні науки. – Одеса: СМІЛ, 2003. – Вип. 4. – С. 156-163.

13. *Чирков С.Н., Бызова Н.А., Шевелева А.А., Митрофанова І.В., Приходько Ю.Н., Дзантиев Б.Б., Атабеков И.Г.* Испытание отечественных иммунохроматографических тест-полосок для экспресс-диагностики вируса шарки сливы // Сельскохозяйственная биология. – 2012. – № 1. – С. 110-116.

14. *Budzanivska I., Usko L., Gospodaryk A., Melnyk M., Polischuk V.* Epidemiology of sharka disease in Ukraine // Acta Hort. – 2011. – 899. – P. 57-63.

15. *Cambra M., Asensio M., Gorris M.T., Pérez E., Camarasa E., García J.A., Moya J.J., López-Abella D., Vela C. & Sanz A.* Detection of *Plum pox potyvirus* using monoclonal

antibodies to structural and non-structural proteins // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 1994. – 24. – P. 569–577.

16. Cambra M., Boscia D., Myrta A., Palkovics L., Navrátil M., Barba M., Gorris M.T., Capote N. Detection and characterization of *Plum pox virus*: serological methods // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2006. – 36. – P. 254–261.

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

18. Cambra M., Capote N., Olmos A., Bertolini E., Gorris M.T., Africander N.L., Levy L., Lenardon S.L., Clover G., Wright D. Proposal for a new international protocol for detection and identification of *Plum pox virus*. Validation of the techniques // Acta Hort. – 2006. – N 781. – P. 181–191.

19. Candresse T., Cambra M. Causal agent of sharka disease: historical perspective and current status of *Plum pox virus* strains // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2006. – 36. – P. 239–246.

20. Capote N., Gorris M.T., Martínez M.C., Asensio M., Olmos A., Cambra M. 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. – 2006. – 96. – P. 320–325.

21. Damsteegt V.D., Scorza R., Stone A.L., Schneider W.L., Webb K., Demuth M., Gildow F.E. *Prunus* host range of *Plum pox virus* (PPV) in the United States by aphid and graft inoculation // Plant Disease. – 2007. – 91. – P. 18–23.

22. Damsteegt V.D., Waterworth H.E., Mink G.I., Howell W.E., Levy L. *Prunus tomentosa* as a diagnostic host for detection of *Plum pox virus* and other *Prunus* viruses // Plant Disease. – 1997. – 81. – P. 329–332.

23. Danks C., Barker I. On-site detection of plant pathogens using lateral flow devices // EPPO Bulletin. – 2000. – 30. – P. 421–426.

24. Diagnostic protocol for regulated pests. *Plum pox virus* // EPPO Bulletin. – 2004. – 34. – P. 247–256.

25. Diagnostic protocols for regulated pests. *Tomato spotted wilt tospovirus*, *Impatiens necrotic spot tospovirus* and *Watermelon silver mottle tospovirus* // EPPO Bulletin. – 2004. – 34. – P. 271–279.

26. Diagnostic protocols for regulated pests. *Beet necrotic yellow vein virus* (*benyvirus*) // EPPO Bulletin. – 2006. – 36. – P. 429–440.

27. Desvignes J.C. Virus diseases of fruit trees.. – Paris: CTIFL: Centr'imprint, 1999. – 202 p.

28. Gentil P. Detection of *Plum pox virus*: biological methods // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2006. – 36. – P. 251–253.

29. James D., Glasa M. Causal agent of sharka disease: New and emerging events associated with *Plum pox virus* characterization // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2006. – 36. – P. 247–250.

30. Karsai A., Müller S., Platz S., Hauser M.T. Evaluation of a homemade SYBR Green I reaction mixture for real-time PCR quantification of gene expression // Biotechniques. – 2002.. – 32. – P. 790–796.

31. Kondratenko P., Udovichenko V. *Plum pox virus* (PPV) in Ukraine // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2006. – 36. – P. 217.

32. Kunze L., Krczal H. Transmission of sharka virus by aphids // Fruit Tree Virus diseases: 8th European Symposium, Paris, France, 1971. – Paris: INRA, 1971. – P. 255–260.

33. Kusano N., Hirashima K., Kuwahara M., Narahara K., Imamura T., Mimori T., Nakahira K., Torii K. Immunochromatographic assay for simple and rapid detection of

*Satsuma dwarf virus* and related viruses using monoclonal antibodies // J. Gen. Plant Pathol. – 2007. – 73. – P. 66-71.

34. Labonne G., Dallot S. Epidemiology of sharka disease in France // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2006. – 36. – P. 267-270.

35. Maejima K., Hoshi H., Hashimoto M., Himeno M., Kawanishi T., Komatsu K., Yamaji Y., Hamamoto H., Namba S. First report of *Plum pox virus* infecting Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) // Japan. J. Gen. Plant Pathol. – 2010. – 76. – P. 229-231.

36. Norkus T., Staniulis J., Žižyte M., Melnyk M., Yusko L., Snihur H., Budzavinska I., Polischuk V. Molecular identification of *Plum pox virus* isolates from Lithuania and Ukraine // Zemdirbyste-Agriculture. – 2008. – Vol. 95, № 3. – P. 277-285.

37. Olmos A., Bertolini E., Cambra M. Simultaneous and co-operational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses // Journal of Virological Methods. – 2002. – 106. – P. 51-59.

38. 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 // Journal of Virological Methods. – 1997. – 68. – P. 127-137.

39. Olmos A., Capote N., Bertolini E., Cambra M. Molecular diagnostic methods for plant viruses / Eds. Z.K. Punja, S. DeBoer, H. Sanfacon // Biotechnology and plant disease management: pp. 227-249. – Wallingford: UK and Cambridge: USA: CAB International, 2007. – 574 p.

40. Salomone A., Mongelli M., Roggero P., Boscia D. Reliability of detection of *Citrus tristeza virus* by an immunochromatographic lateral flow assay in comparison with ELISA // J. Plant Pathol. – 2004. – 86. – P. 43-48.

41. Salomone A., Roggero P. Host range, seed transmission and detection by ELISA and lateral flow of an Italian isolate of pepino mosaic virus // J. Plant Pathol. – 2002. – 84. – P. 65-68.

42. Sochor J., Babula P., Adam V., Krska B., Kizek R. Sharka. The Past, The Present and The Future // Viruses. – 2012. – 4. – P. 2853-2901.

43. Šubr Z., Pittnerova S., Glasa M. A simplified RT-PCR-based detection of recombinant *Plum pox virus* isolates // Acta Virologica. – 2004. – 48. – P. 173-176.

44. Ulubaş Serçe Ç., Candresse T., Svanella-Dumas L., Krizbai L., Gazel M., Çağlayan K. Further characterization of a new recombinant group of *Plum pox virus* isolates, PPV-T, found in the Ankara province of Turkey // Virus Research. – 2009. – 142. – P. 121-126.

45. Varga A., James D. Detection and differentiation of *Plum pox virus* using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing // Journal of Virological Methods. – 2005. – 123. – P. 213-220.

46. Varga A., James D. 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 // Journal of Virological Methods. – 2006. – 132. – P. 146-153.

**Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Chirkov S.N., Lesnikova-Sedoshenko N.P. Methodological approaches to Sharka (*Plum pox virus*) detection and identification on the different species of genus *Prunus* // Works of the State Nikit. Botan. Gard. – 2014. – V. 138. – P. 137-161.**

The methodical approach and the results of long-term research concerning the monitoring the spread of sharka virus (*Plum pox virus*) in the south of Ukraine and Crimea have been presented. The paper contains the information about the pest and symptoms of disease caused by *Plum pox virus*. The characteristic of *Plum pox virus* and features of phytopathogen identification have been recorded. Basic techniques of *Plum pox virus* identification have been demonstrated: a biological method, ELISA-test, immunoassay analysis and PCR-analysis.

**Key words:** *Plum pox virus*, monitoring, symptoms, identification methods.