

УДК 578.2

DOI 10.30679/2219-5335-2022-6-78-275-286

**ОПТИМИЗАЦИЯ
МЕТОДА
ПЦР-ДИАГНОСТИКИ
ВИРУСА ШАРКИ СЛИВЫ**

Федорович Святослав Валерьевич
младший научный сотрудник
лаборатории вирусологии

Супрун Иван Иванович
канд. биол. наук
заведующий ФНЦ «Селекции
и питомниководства»

Степанов Илья Владимирович
младший научный сотрудник
селекционно-биотехнологической
лаборатории

*Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«Северо-Кавказский федеральный
научный центр садоводства,
виноградарства, виноделия»,
Краснодар, Россия*

Вирус плодовых культур оказывает негативное влияние на сроки созревания и качество плодоношения растений. Для закладки садов необходимо использовать растения, свободные от вирусов. Вирус шарки сливы является серьезной угрозой для садоводства, так как имеет широкий спектр растений – носителей и способен в короткие сроки распространяться в садовых насаждениях. Методы эффективной диагностики данного вируса имеют высокое значение для производства безвирусного посадочного материала. В данной работе представлены результаты апробации и оптимизации методики диагностики вируса шарки сливы с применением метода ПЦР с обратной транскрипцией, а также оценка его эффективности в сравнении с коммерческим набором. В качестве материала выступали различные ткани подвоев ПКСК 1, АИ 1, ВСЛ 1

UDC 578.2

DOI 10.30679/2219-5335-2022-6-78-275-286

**IMPROVEMENT
OF THE PCR METHOD
FOR THE DIAGNOSIS
OF THE PLUM SHARK VIRUS**

Fedorovich Svyatoslav Valeryevich
Junior Research Associate
of Laboratory of Virology

Suprun Ivan Ivanovich
Cand. Biol. Sci.
Head of Breeding
and Nursery FSC

Stepanov Ilya Vladimirovich
Junior Research Associate
of Breeding and Biotechnology
Laboratory

*Federal State Budget
Scientific Institution
«North Caucasian Federal
Scientific Center of Horticulture,
Viticulture, Wine-making»,
Krasnodar, Russia*

Fruit crop virus has a negative effect on the timing of ripening and quality of fruit-bearing of plants. Virus free plants should be used for orchard set-up. Plum virus pox disease is a serious threat to horticulture because it has a wide range of host plants and able to spread in orchards in a short time. Methods for effective diagnosis of this virus are of high importance for the production of virus-free planting material. This work presents the results of testing and optimization of the method of plum virus pox disease diagnosis using PCR method with reverse transcription, as well as the evaluation of its effectiveness in comparison with commercial kit. Various tissues of PKSK 1, AI 1, VSL 1, and Gizela 5 rootstocks obtained in apical meristem culture and plum plants of Stanley cultivar

и Гизела 5, полученных в культуре апикальных меристем и растения сливы сорта Стенлей. Была оптимизирована концентрация в соотношении добавленных нами Oligo dT (Oligo(dT)15-primer) и Random (Random (dN)10-primer) праймеров (1:2), с целью увеличения выхода специфических фрагментов вирусной кДНК. Праймерная пара контроля амплификации подобрана к участку гена, кодирующего малую субъединицу рибулоза 1,5 – бисфосфат карбоксилазы/оксигеназы. Для сравнительной оценки использовали пробы кДНК растений, полученных в культуре апикальных меристем *in vitro* и пробы симптомированных растений. После получения препарата тотальной РНК проводили обратную транскрипцию и амплификацию полученной кДНК с последующим анализом продуктов на агарозном геле. В образцах не наблюдались продукты неспецифической амплификации и одноцепочечной ДНК. Продукты амплификации положительного контроля наблюдались во всех исследованных образцах. Исследованный нами метод показал высокую эффективность в сравнении с контрольным.

Ключевые слова:

ВИРУС ШАРКИ СЛИВЫ, ОТ-ПЦР, ПОСАДОЧНЫЙ МАТЕРИАЛ, КЛОНОВЫЕ ПОДВОИ, ВИРУСЫ КОСТОЧКОВЫХ КУЛЬТУР

ere used as the material.

The concentration in the ratio of Oligo dT (Oligo(dT)15-primer) and Random (Random (dN)10-primer) primers we added was optimized (1:2), in order to increase the yield of specific viral cDNA fragments. The primer pair of the amplification control was matched to the region of the gene encoding the small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. For comparative evaluation, cDNA samples from plants obtained *in vitro* apical meristem culture and samples from symptomatic plants were used. After obtaining the preparation of total RNA, reverse transcription and amplification of the obtained cDNA were performed, followed by analysis of the products on an agarose gel. No nonspecific amplification products and single-stranded DNA were observed in the samples. Amplification products of positive controls were observed in all samples examined. The method we studied showed high efficiency compared to the control method.

Key words:

PLUM VIRUS POX DISEASE, RT-PCR, PLANTING MATERIAL, CLONAL ROOTSTOCKS, STONE FRUIT VIRUSES.

Введение. Для ведения садоводства интенсивного типа необходимо использование клоновых повоев. Они влияют на сроки вступления растений в фазу плодоношения и обеспечивают сдержанный рост, что в разы увеличивает урожайность растения и качество плодов [1]. Преимуществом современных клоновых подвоев, кроме продуктивности привитых сортов, является генетическая стабильность, однородность, устойчивость к факторам абиотического и биотического стресса окружающей среды, отсутствие корневой поросли, высокая степень совместимости с сортами [2]. Размножение клоновых подвоев производят двумя способами: черенкованием или культурой меристем с применением технологии *in vitro*. В первом случае,

возможно получение посадочного материала в кратчайшие сроки, однако применение технологии *in vitro* позволяет параллельно производить процесс оздоровления растений [3]. Известно, что оздоровленные растения гораздо дольше сохраняют свои свойства по сравнению с безвирусными, так как вирусы растений напрямую оказывают влияние на метаболизм [4].

Получение посадочного материала клоновых подвоев методами микроклонального размножения имеет высокую эффективность и не требует больших площадей, в сравнении с зелёным черенкованием. Клеточные культуры, полученные из апикальных меристем, как правило свободны от большинства вирусов косточковых культур. Это достигается посредством комбинирования методов выращивания растений на питательных средах и применением методов терапии микрорастений или саженцев на этапе адаптации к нестерильным условиям. Безусловно, оздоровление таким способом не может иметь 100 % эффективности [5]. По этой причине, для получения посадочного материала, свободного от вирусов и фитоплазм, необходимо проводить ретестирование растений на наличие этих объектов в оздоровленном материале.

Согласно ГОСТ Р– 59653-2021, распространение и закладка насаждений возможна посадочным материалом, свободным от вирусов и фитоплазм, указанных в данном стандарте. Одним из таких вирусов является вирус оспы сливы (PPV), который относится к семейству *Potyvirus* и вызывает заболевание – шарку сливы. Это заболевание может распространяться со скоростью от 2-5 % в год. Более того, в силу специфики заболевания шарка может вызывать сброс завязи или плодов [6].

Наиболее распространёнными методами идентификации вирусов растений на данный момент являются следующие методы: метод с применением растений индикаторов (биометод), метод серологического анализа (иммуноферментный анализ (ИФА)); метод генетического анализа

(полимеразная цепная реакция (ПЦР)). Биометод основан на применении растений, чувствительных к исследуемому вирусу. Данный метод весьма сложен в исполнении и требует временных и трудовых затрат [7]. Более того, метод не всегда даёт желаемый результат из-за особенностей физиологии растения носителя. Метод ИФА обладает более высокой чувствительностью по сравнению с биометодом, при этом проводится в течение двух дней, также ИФА-метод позволяет проводить и количественную оценку вирусных частиц в растении [8].

Наиболее же чувствительным из перечисленных методов является ПЦР метод. Вся процедура идентификации вируса данным методом в среднем занимает 5-6 часов, что по большей части определяется методом выделения РНК вируса. Для идентификации вирусов необходимо получить на основе РНК матрицы кДНК матрицу, что в среднем занимает 30 минут. Данный метод широко используется при идентификации вирусов косточковых культур и имеет перспективы к развитию [9].

Известен широкий перечень работ, посвященных разработке методов диагностики вируса шарки сливы на основе метода ПЦР, включая ПЦР в режиме реального времени и мультиплексной детекции данного вируса в сочетании с другими [10-16]. Кроме того, имеется ряд тест-систем для детекции данного вируса, включая тест-системы отечественных производителей, таких как наборы производства компаний Синтол и Агродиагностика.

В связи с актуализацией вопроса получения растений плодовых культур, свободных от вирусных патогенов, целью данного исследования являлась апробация и оптимизация экспериментальных параметров методики идентификации вируса шарки сливы с применением метода ПЦР с обратной транскрипцией, а также оценка его эффективности в сравнении с коммерческим набором производства компании «Агродиагностика».

Объекты и методы исследований. Объектами исследования послужили растения подвоев ПКСК 1, АИ 1, ВСЛ 1 и Гизела 5, полученные в культуре апикальных меристем, а также растения сливы домашней сорта Стенлей, с симптомами заражения вирусом шарки.

Метод отбора пробы: в отдельные пакеты типа zip-lock отбирались зелёные листья с различной части кроны подвоев. Перевозка образцов осуществлялась в термоконтейнерах при температуре 5-10 °С. Выделение тотальной РНК производили непосредственно после перевозки [17].

Пробоподготовку производили двумя способами – по протоколу коммерческого набора ООО «Агродиагностика» – «Проба НК» и с использованием керамической ступки, пестика и жидкого азота.

Выделение РНК производили согласно протоколу «ООО» Агродиагностика – «Проба НК» и методу, описанному в работе [18].

Для проведения реакции обратной транскрипции был выбран набор MMLV kit – «ООО» Евроген (протокол оптимизирован). А также набор «ООО» Агродиагностика – Комплект реагентов для проведения обратной транскрипции.

ПЦР проводили в двух вариантах, согласно протоколу набора «ООО» Агродиагностика – «Комплекты реагентов для диагностики болезней и вредителей плодовых культур. Вирус шарки сливы (Plum Pox virus) диагностировали с комплектом реактивов из того же набора и согласно методике [18]. Во втором случае использовали набор компании «ООО» Евроген Таq-ДНК полимеразы (оптимизировано под задачи исследования). Электрофорез продуктов реакции проводили в 2 % агарозном геле.

Праймерные пары были отобраны согласно работе J.A. Sanchez-Navarro с соавторами [18]. Использовали праймерные пары для идентификации вируса и для внутреннего положительного контроля – PPV-F: CAATAAAGCCATTGTTGGATC; PPV-R: CTCTGTGTCCTCTTCTTGTG; Rbcl-F: TACTTGAACGCTACTGCAG; Rbcl-R: CTGCATGCATTGCACGGTG.

Анализ качества праймерных пар проводили с использованием программ Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher Scientific, США); Primer-BLAST (NCBI, США); Tm Calculator | Oligo melting temperature (Promega, США).

Обсуждение результатов. В ходе работы нами было исследовано четыре образца, заражённых вирусом шарки сливы и имеющих ярко выраженные симптомы заболевания (рис. 1). Также оценку провели для семи растений, полученных в культуре апикальных меристем, не имеющих симптомов наличия данного вируса и являющихся потенциально свободными от него. Для полученных препаратов РНК изучаемых растений спектрофотометрически определили чистоту: по показателям экстинкции 280/260 нм и 260/230 нм она варьировала от 1.8 до 2.3, что позволяет говорить об их пригодности для выполнения анализа.



Рис. 1. Растение сливы домашней с симптомами заражения вирусом шарки сливы

В ходе исследования, при апробации праймерных пар была выполнена оптимизация протоколов ОТ-ПЦР и ПЦР с целью повышения специфичности реакции и, соответственно, повышения уровня амплификации целевых фрагментов при отсутствии неспецифически амплифицированных фрагментов или минимальном уровне их амплификации.

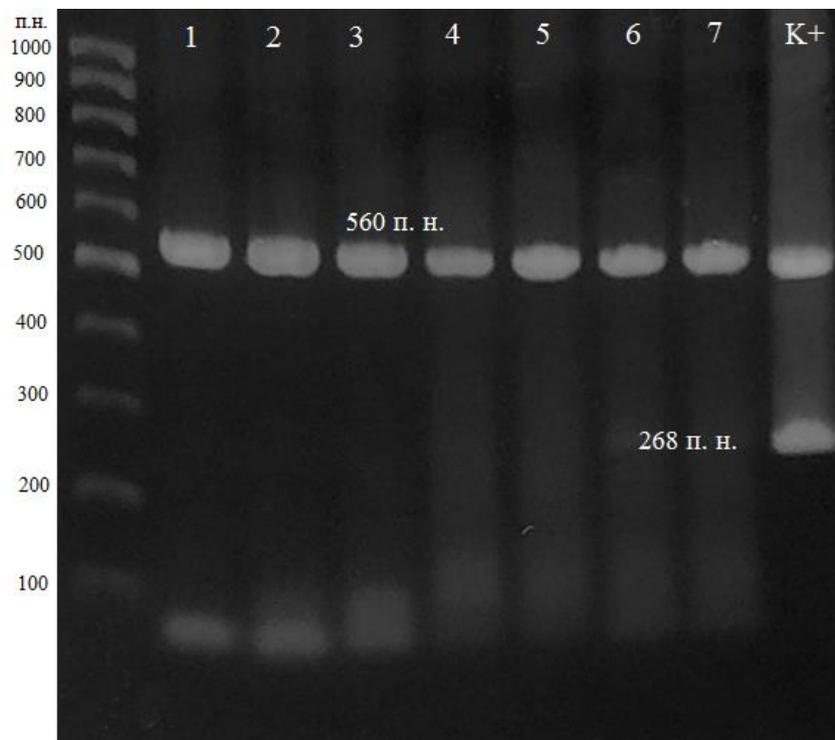
Наилучшие результаты были достигнуты при проведении первоначальной инкубации при 50 °С в течение 30 мин для синтеза кДНК, за которой следовала денатурация фермента ревертазы. Ингибирование фермента производили путем инкубации 2 мин при 94 °С. Затем производили 40 циклов денатурации при 94 °С в течение 15 сек, отжига праймера при 50 °С в течение 30 с элонгацией при 68 °С в течение 1 мин. Финальную элонгацию проводили при 68 °С в течение 10 мин для завершения неполных фрагментов ПЦР. Данные параметры реакции использовались в дальнейшей работе при проведении сравнительной оценки эффективности использования апробированного метода и метода, основанного на применении тест-системы.

Реакцию обратной транскрипции модифицировали в соответствии с рекомендациями набора, также была оптимизирована концентрация в соотношении добавленных нами Oligo dT (Oligo(dT)₁₅-primer) и Random (Random (dN)₁₀-primer) праймеров (1:2), с целью увеличения выхода специфических фрагментов вирусной кДНК [19, 20].

Праймерная пара контроля амплификации подобрана к участку гена, кодирующего малую субъединицу рибулоза 1,5 – бисфосфат карбоксилазы/оксигеназы. Данное решение было принято на основании того, что в полученном материале тотальной РНК будет находиться большое количество копий генов данного участка, так как экспрессия рибулоза 1,5 – бисфосфат карбоксилазы/оксигеназы находится на высоком уровне [21].

Для сравнительной оценки использовали пробы кДНК растений, полученных в культуре апикальных меристем *in vitro*, и пробы симптомированных растений. На первом этапе работы растения проанализировали с

использованием тест-системы для диагностики вируса шарки сливы, производства компании «Агродиагностика». На рисунке 2 приведены результаты тестирования растений, полученные с использованием данной тест-системы.



Примечания: 1, 2 – ПКСК 1; 3 – АИ 1; 4, 5 – ВСЛ 1; 6, 7 – Гизела 5; К+ – внешний положительный контроль

Рис. 2. Результаты ПЦР-анализа микроклонально размножаемых образцов на наличие вируса шарки (PPV)

Из рисунка видно, что образцы 1-7 не имеют фрагмента а размером 286 пар нуклеотидов (п.н.) – это означает отсутствие вируса шарки у них. Данный фрагмент представлен только у положительного контроля. Продукт амплификации с размером 560 пар нуклеотидов представлен у всех образцов – это внутренний контроль амплификации, подтверждающий прохождение реакции у всех образцов и отсутствие факторов, которые бы препятствовали амплификации фрагмента, специфичного для вируса шарки сливы, в случае его наличия у образцов.

На следующем этапе работы провели ПЦР-анализ по апробируемым праймерным парам. При этом использовали пробы кДНК растений, свободных от вируса шарки, согласно данным, полученным с использованием тест-системы производства компании «Агродиагностика», а также пробы кДНК симптомированных растений. Результаты приведены на рисунке 3.

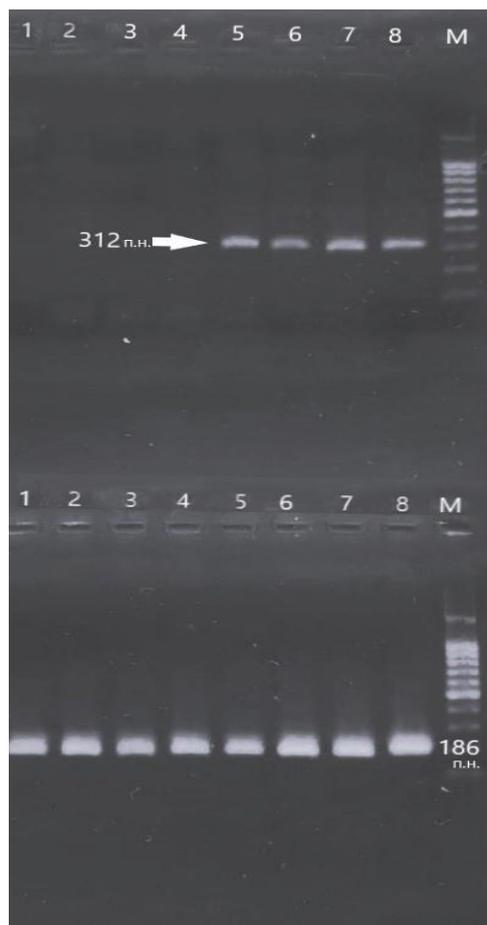


Рис. 3. Данные электрофореза в агарозном геле

Примечания: 1, 2 – ПКСК 1 (*in vitro*); 3 – АИ 1; 4 – ВСЛ 1 (*in vitro*); 5-8 – пробы образцов симптомированных растений сливы домашней

Из рисунка видно, что в верхней половине электрофоретического геля, у образцов 1-4 отсутствует фрагмент размером 312 пар нуклеотидов, который свидетельствует о наличии вируса шарки сливы. Данный фрагмент

присутствует у образцов 5-8. При этом у всех образцов идентифицируется контроль амплификации – продукт ПЦР размером 186 пар нуклеотидов.

Данные о наличии/отсутствии вируса шарки сливы, полученные по результатам апробации праймерных пар, согласуются с данными анализа с применением тест-системы «Агродиагностика», что свидетельствует о перспективности их использования.

Заключение. Таким образом, апробированный нами метод, показал высокую эффективность при идентификации вируса шарки сливы. Он может являться альтернативой использования коммерческих тест-систем, имеющих в реализации на территории РФ. Применение данного метода дает возможность снизить себестоимость ПЦР-детекции целевого вируса.

Литература

1. Оценка продуктивности сливы на подвоях отечественной селекции и почвах с лимитирующими параметрами [Электронный ресурс] / Е.А. Черников [и др.] // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2021. № 70(4). С. 129-145. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/21/04/12.pdf>. DOI: 10.30679/2219-5335-2021-4-70-129-145 (дата обращения: 03.11.2022).
2. Основные результаты комплексных исследований СКФНЦСВВ и СОСС по селекции плодовых растений / Е.В. Ульяновская [и др.] // Научные труды СКФНЦСВВ. Т. 27. Краснодар: СКФНЦСВВ, 2020. С. 17-31.
3. Ключевые вопросы биотехнологии в размножении и оздоровлении садовых культур [Электронный ресурс] / И.И. Супрун И. [и др.] // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2021. № 71(5). С. 96-115. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/21/05/07.pdf>. DOI: 10.30679/2219-5335-2021-5-71-96-115 (дата обращения: 03.11.2022)
4. Collum T. D. et al. Translatome profiling of Plum pox virus-infected leaves in European plum reveals temporal and spatial coordination of defense responses in phloem tissues //Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2020. – Т. 33. – №. 1. – С. 66-77.
5. Применение биотехнологических методов в оздоровлении растений и размножении безвирусного посадочного материала перспективных цветочно-декоративных культур / О.В. Митрофанова [и др.] // Биология растений и садоводство: теория, инновации. 2014. №. 138. С. 5-56.
6. Бунцевич Л.Л., Костюк М.А., Данилюк Ю.П., Палецкая Е.Н. Восприимчивость сортов сливы к вирусу шарки сливы [Электронный ресурс] // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2011. № 10(4). С. 126-130. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/11/04/14.pdf>. (дата обращения: 03.11.2022).
7. Damsteegt V. D. et al. *Prunus tomentosa* as a diagnostic host for detection of Plum pox virus and other Prunus viruses //Plant Disease. – 1997. – Т. 81. – №. 4. – С. 329-332.
8. Adams A. N. The detection of plum pox virus in Prunus species by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) //Annals of Applied Biology. – 1978. – Т. 90. – №. 2. – С. 215-221.

9. Subr Z., Pittnerova S., Glasa M. A simplified RT-PCR-based detection of recombinant Plum pox virus isolates // *Acta virologica*. – 2004. – Т. 48. – №. 3. – С. 173-176.
10. Pallas V., Navarro A., Flores R. Isolation of a viroid-like RNA from hop different from hop stunt viroid // *Journal of General Virology*. – 1987. – Т. 68. – №. 12. – С. 3201-3205.
11. Neumüller M. Fundamental and applied aspects of plum (*Prunus domestica*) breeding // *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*. – 2011. – Т. 5. – №. 1. – С. 139-156.
12. Gürcan K., Ceylan A. Strain identification and sequence variability of plum pox virus in Turkey // *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. – 2016. – Т. 40. – №. 5. – С. 746-760.
13. Chirkov S. et al. New highly divergent Plum pox virus isolates infecting sour cherry in Russia // *Virology*. – 2017. – Т. 502. – С. 56-62.
14. Loera-Muro A. et al. Identification of Plum pox virus causing sharka disease on peach (*Prunus persica* L.) in Mexico // *Canadian Journal of Plant Pathology*. – 2017. – Т. 39. – №. 1. – С. 83-86.
15. Rezende J. A. M., Camelo V. M., Kitajima E. W. First report on detection of Plum pox virus in imported peach fruits in Brazil // *Plant Disease*. – 2016. – Т. 100. – №. 4. – С. 869-869.
16. Celik A., Ertunç F. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) of plum pox potyvirus Turkey (PPV-T) strain // *Journal of Plant Diseases and Protection*. – 2021. – Т. 128. – №. 3. – С. 663-671.
17. Kil E. J. et al. Plum pox virus: diagnosis and spread inhibition by weed control // *Journal of Plant Diseases and Protection*. – 2021. – Т. 128. – №. 4. – С. 1091-1099.
18. Sanchez-Navarro J. A. et al. Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one-step RT-PCR // *European Journal of Plant Pathology*. – 2005. – Т. 111. – №. 1. – С. 77-84.
19. Zhou J. et al. Occurrence, Distribution, and Genomic Characteristics of Plum Pox Virus Isolates from Common Apricot (*Prunus armeniaca*) and Japanese Apricot (*Prunus mume*) in China // *Plant Disease*. – 2021. – Т. 105. – №. 11. – С. 3474-3480.
20. Escalettes V. S. L. et al. Plum pox virus induces differential gene expression in the partially resistant stone fruit tree *Prunus armeniaca* cv. Goldrich // *Gene*. 2006. Т. 374. С. 96-103.
21. Jailani A. A. K. et al. Development of a simple one-step multiplex RT-PCR system for simultaneous detection of DNA and RNA viruses of Cucurbit leaf crumple virus, Cucurbit yellow stunting disorder virus, Squash vein yellowing virus, and Cucurbit chlorotic yellows virus // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. – 2021. – Т. 116. – С. 101734.

References

1. Ocenka produktivnosti slivy na podvoyah otechestvennoj selekcii i poch-vah s limitiruyushchimi parametrami [Elektronnyj resurs] / E.A. Chernikov [i dr.] // *Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii*. 2021. № 70(4). S. 129-145. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/21/04/12.pdf>. DOI: 10.30679/2219-5335-2021-4-70-129-145 (data obrashcheniya: 03.11.2022).
2. Osnovnye rezul'taty kompleksnyh issledovaniy SKFNCSVV i SOSS po selekcii plodovyh rastenij / E.V. Ul'yanovskaya [i dr.] // *Nauchnye trudy SKFNCSVV*. Т. 27. Krasnodar: SKFNCSVV, 2020. S. 17-31.
3. Klyuchevye voprosy biotekhnologii v razmnozhenii i ozdorovlenii sadovyh kul'tur [Elektronnyj resurs] / I.I. Suprun I. [i dr.] // *Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii*. 2021. № 71(5). S. 96-115. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/21/05/07.pdf>. DOI: 10.30679/2219-5335-2021-5-71-96-115 (da-ta obrashcheniya: 03.11.2022)
4. Collum T. D. et al. Translatome profiling of Plum pox virus-infected leaves in European plum reveals temporal and spatial coordination of defense responses in phloem tissues // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2020. – Т. 33. – №. 1. – S. 66-77.

5. Primenenie biotekhnologicheskikh metodov v ozdorovlenii rastenij i razmnozhenii bezvirusnogo posadochnogo materiala perspektivnyh cvetochno-dekorativnyh kul'tur / O.V. Mitrofanova [i dr.] // *Biologiya rastenij i sadovodstvo: teoriya, innovacii*. 2014. № 138. S. 5-56.
6. Bunceovich L.L., Kostyuk M.A., Danilyuk Yu.P., Paleckaya E.N. Vospriimchivost' sortov slivy k virusu sharki slivy [Elektronnyj resurs] // *Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii*. 2011. № 10(4). S. 126-130. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/11/04/14.pdf>. (data obrashcheniya: 03.11.2022).
7. Damsteegt V. D. et al. *Prunus tomentosa* as a diagnostic host for detection of Plum pox virus and other *Prunus* viruses // *Plant Disease*. – 1997. – T. 81. – №. 4. – S. 329-332.
8. Adams A. N. The detection of plum pox virus in *Prunus* species by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) // *Annals of Applied Biology*. – 1978. – T. 90. – №. 2. – S. 215-221.
9. Subr Z., Pittnerova S., Glasa M. A simplified RT-PCR-based detection of recombinant Plum pox virus isolates // *Acta virologica*. – 2004. – T. 48. – №. 3. – S. 173-176.
10. Pallas V., Navarro A., Flores R. Isolation of a viroid-like RNA from hop different from hop stunt viroid // *Journal of General Virology*. – 1987. – T. 68. – №. 12. – S. 3201-3205.
11. Neumüller M. Fundamental and applied aspects of plum (*Prunus domestica*) breeding // *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*. – 2011. – T. 5. – №. 1. – S. 139-156.
12. Gürcan K., Ceylan A. Strain identification and sequence variability of plum pox virus in Turkey // *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. – 2016. – T. 40. – №. 5. – S. 746-760.
13. Chirkov S. et al. New highly divergent Plum pox virus isolates infecting sour cherry in Russia // *Virology*. – 2017. – T. 502. – S. 56-62.
14. Loera-Muro A. et al. Identification of Plum pox virus causing sharka disease on peach (*Prunus persica* L.) in Mexico // *Canadian Journal of Plant Pathology*. – 2017. – T. 39. – №. 1. – S. 83-86.
15. Rezende J. A. M., Camelo V. M., Kitajima E. W. First report on detection of Plum pox virus in imported peach fruits in Brazil // *Plant Disease*. – 2016. – T. 100. – №. 4. – S. 869-869.
16. Selik A., Ertunç F. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) of plum pox potyvirus Turkey (PPV-T) strain // *Journal of Plant Diseases and Protection*. – 2021. – T. 128. – №. 3. – S. 663-671.
17. Kil E. J. et al. Plum pox virus: diagnosis and spread inhibition by weed control // *Journal of Plant Diseases and Protection*. – 2021. – T. 128. – №. 4. – S. 1091-1099.
18. Sanchez-Navarro J. A. et al. Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one-step RT-PCR // *European Journal of Plant Pathology*. – 2005. – T. 111. – №. 1. – S. 77-84.
19. Zhou J. et al. Occurrence, Distribution, and Genomic Characteristics of Plum Pox Virus Isolates from Common Apricot (*Prunus armeniaca*) and Japanese Apricot (*Prunus mume*) in China // *Plant Disease*. – 2021. – T. 105. – №. 11. – S. 3474-3480.
20. Escalettes V. S. L. et al. Plum pox virus induces differential gene expression in the partially resistant stone fruit tree *Prunus armeniaca* cv. Goldrich // *Gene*. 2006. T. 374. S. 96-103.
21. Jailani A. A. K. et al. Development of a simple one-step multiplex RT-PCR system for simultaneous detection of DNA and RNA viruses of Cucurbit leaf crumple virus, Cucurbit yellow stunting disorder virus, Squash vein yellowing virus, and Cucurbit chlorotic yellows virus // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. – 2021. – T. 116. – S. 101734.