

УДК 578.2

DOI 10.30679/2219-5335-2023-3-81-279-289

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА
МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ
ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСА ШАРКИ
СЛИВЫ И ГЕНА БОЛЬШОЙ
СУБЪЕДИНИЦЫ РИБУЛОЗО-1,5-
БИСФОСФАТКАРБОКСИЛАЗЫ/
ОКСИГЕНАЗЫ КАК ВНУТРЕННЕГО
ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ
АМПЛИФИКАЦИИ**

Федорович Святослав Валерьевич¹
младший научный сотрудник
лаборатории вирусологии

Супрун Иван Иванович¹
канд. биол. наук
заведующий ФНЦ
«Селекции и питомниководства»

Упадышев Михаил Тарьевич²
член-корр. РАН
д-р с.-х. наук
главный научный сотрудник
лаборатории защиты растений

¹Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«Северо-Кавказский федеральный
научный центр садоводства,
виноградарства, виноделия»,
Краснодар, Россия

²Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«Федеральный научный
селекционно-технологический центр
садоводства и питомниководства»,
Москва, Россия

Вирус шарки сливы в насаждениях
косточковых культур является одним
из факторов увеличения затрат на возделывание
этих культур. На территории Российской
Федерации, в регионах средней полосы
заражение насаждений косточковых культур
может достигать 41-50 %, что является
серьёзной угрозой для производственного

UDC 578.2

DOI 10.30679/2219-5335-2023-3-81-279-289

**DEVELOPMENT OF A METHOD
FOR MULTIPLEX
IDENTIFICATION OF THE PLUM
POX VIRUS AND THE GENE
OF THE LARGE SUBUNIT
OF RIBULOSE-1,5-BISPHOSPHATE
CARBOXYLASE/OXYGENASE
AS AN INTERNAL POSITIVE
CONTROL OF AMPLIFICATION**

Fedorovich Svyatoslav Valeryevich¹
Junior Research Associate
of Virology Laboratory

Suprun Ivan Ivanovich¹
Cand. Biol. Sci.
Head of «Breeding and Nursery»
FSC

Upadyshev Mikhail Taryevich²
Corresponding Member of the RAS
Dr. Sci. Agr.
Chief Research Associate
of Plant Protection Laboratory

¹Federal State Budget
Scientific Institution
«North Caucasian Federal
Scientific Center of Horticulture,
Viticulture, Wine-making»,
Krasnodar, Russia

²Federal State Budgetary
Scientific Organization
«Federal Horticultural Center
for Breeding, Agrotechnology
and Nursery»,
Moskov, Russia

Plum pox virus in stone fruit crop
plantings is one of the factors increasing
the cost of cultivation of these crops.
Infestation of stone fruit crops can
reach 41-50 % in the Russian
Federation regions of the middle zone,
which is a serious threat
to the production process.

процесса. Заражённость этим вирусом часто приводит к сбросу листьев, завязей и плодов у чувствительных сортов. Способы борьбы с данным вирусом дорогостоящие, реализовать их в технологическом процессе довольно сложно. Наиболее эффективный подход – мониторинг насаждений и элиминация заражённых растений. Так как PPV содержит в своей структуре РНК, при анализе необходимо получить качественный препарат тотальной РНК. Для получения сведений о качестве выделенной РНК, часто используют внутренние положительные контроли ОТ-ПЦР. В данной работе была выполнена отработка метода идентификации вируса шарки сливы при использовании дуплекса с внутренним контролем амплификации. В качестве контроля использовали ген большой субъединицы рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы, поскольку имеет стабильную экспрессию и обладает высоким числом копий мРНК. Материалом для данного исследования послужили листья растений сливы домашней сорта Кабардинская ранняя (*Prunus domestica* L.), собранные в начале и конце мая в г. Краснодаре (Краснодарский край). Анализ проводили с использованием молекулярно-биологических методов обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Детекцию продуктов амплификации проводили в 2% агарозном геле. Вирус шарки сливы был диагностирован во всех исследуемых образцах симптомированного материала. Для проведения мультиплексной ПЦР с исследуемыми праймерными парами необходимо использовать градиентный отжиг праймеров с изменением температуры в 3,18 °C/сек. При использовании матрицы кДНК меньше, чем 50 нг/мкл, возможно снижение качества ПЦР. Была отработана и модифицирована методика диагностики вируса шарки сливы с использованием внутреннего контроля амплификации.

Ключевые слова: ВИРУС ШАРКИ СЛИВЫ, ОТ-ПЦР, МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ПЦР, РНК, ВНУТРЕННИЙ КОНТРОЛЬ АМПЛИФИКАЦИИ.

Infection with this virus often causes drop of leaves, ovaries and fruits in susceptible varieties. Methods to combat this virus are expensive and difficult to implement in the technological process. The most effective approach is plantation monitoring and elimination of infected plants. Since PPV contains RNA in its structure, the assay must obtain a quality preparation of total RNA. To obtain information on the quality of the isolated RNA, internal positive controls of RT-PCR are often used. In this work, the method for identification of the plum pox virus using a duplex with an internal amplification control was perfected. The ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene was used as a control because of its stable expression and high mRNA copy number. The material for this study was leaves of Kabardinskaya ranniaya plum (*Prunus domestica* L.), collected in early and late May in Krasnodar (Krasnodar region). The analysis was performed using molecular biological methods of reverse transcription and polymerase chain reaction. Detection of amplification products was performed in 2% agarose gel. Plum pox virus was diagnosed in all examined samples of symptomatic material. Multiplex PCR with the primer pairs under study required the use of gradient annealing of the primers with a temperature change of 3.18 °C/sec. When using a cDNA matrix less than 50 ng/μl, a decrease in PCR quality is possible. A method for the diagnosis of plum pox virus using an internal amplification control was perfected and modified.

Key words: PLUM POX VIRUS, RT-PCR, MULTIPLEX PCR, RNA, INTERNAL AMPLIFICATION CONTROL

Введение. Одним из факторов снижения продуктивности плодоносящих насаждений является вирус шарки сливы (*Plum pox virus*, PPV). На территории Российской Федерации, в регионах средней полосы заражение насаждений косточковых культур может достигать 41-50 %, что является серьёзной угрозой для производственного процесса [1]. Шарка сливы оказывает влияние в первую очередь на фотосинтетический аппарат растений, что часто приводит к сбросу листьев, завязей и плодов у чувствительных сортов [2]. Такие симптомы связаны с репликацией вируса и, как правило, встречаются в весенне-летний период. Основными переносчиками вируса являются тли определенных видов [3].

Из способов борьбы с данным вирусом наиболее эффективными мерами являются превентивные, такие как мониторинг и использование свободного от вирусов посадочного материала. Мониторинг PPV позволяет определить как источник заражения, так и впоследствии локализовать очаг инфекции. Своевременная диагностика посадочного материала в перспективе способна снизить убытки при производстве как плодов, так и посадочного материала в несколько раз [4].

Вирус шарки сливы относится к вирусам с (+)РНК-геномом. Покрывая белками оболочка РНК вируса формирует трубкообразные структуры от 660 до 770 нм длиной и 12,5-20,0 нм шириной. Белок VPg связан с 3'-концом генома и отвечает за движение вируса по растению, с противоположной стороны на 5'-конце располагается поли А фрагмент, защищающий геном от гидролиза ферментами клетки хозяина [5, 6]. Так как PPV содержит в своей структуре РНК, на первом этапе необходимо выделить именно её.

Выделение РНК – рутинный и довольно непростой процесс, поскольку растения содержат в своих тканях как вторичные метаболиты, так и сахара, высокая концентрация которых может ингибировать ферменты при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) и обратной транскрипции

(ОТ). Более того, высокая концентрация сахаров в препарате тотальной РНК приводит к повышению вязкости и изменению pH раствора, что затрудняет дальнейшее осаждение и элюцию РНК. Наиболее распространёнными методами выделения РНК из растений являются методы с использованием диоксида кремния (SiO_2), обеспечивающие высокую степень очистки препарата РНК. Однако даже качественно очищенный препарат РНК может оказаться не пригодным для последующего анализа вследствие возможной деградации РНК. В таком случае качество последующего анализа может быть низким, что приведет к некорректной диагностике образца [7, 8].

Для проведения анализа препаратов тотальной РНК перед обратной транскрипцией необходимо проводить оценку качества этого препарата методами спектрального анализа и гель-электрофореза в денатурирующих условиях [9]. Как правило, наиболее достоверный показатель – это оптическая чистота препарата тотальной РНК, по показателям отношения 260/280 нм и 260/230 нм, которые должны быть не более 2 и не менее 1,8. Данный показатель коррелирует с качеством ПЦР в очень высокой степени. Фотометрический метод, хоть и обеспечивает определенную информацию о качестве препарата и количестве выделенной РНК, не даёт сведений о качестве выделенной РНК. Такой показатель достаточно достоверно отражают данные денатурирующего гель-электрофореза [10]. Данный показатель выражается в виде отношения полос в денатурирующем геле 18s и 28s РНК [11].

Однако данные показатели не применимы при потоковом анализе, когда речь идёт о сотнях образцов. В таком случае необходимо применять внутренний контроль амплификации, отражающий как качество выделенной РНК, так и самого препарата. В качестве внутреннего контроля принято использовать гены, имеющие стабильно высокую экспрессию, такие как: ген субъединицы 5 НАД-дегидрогеназы (*nad5*), β -тубулин и β -актин (АКТВ), глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (GAPD), большой-

субъединицы рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (Rbcl) [12]. Данные гены имеют высокую степень представленности в геноме и стабильную экспрессию, а соответственно, стабильно амплифицируются при проведении ПЦР [13].

Ген большой субъединицы рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы /оксигеназы имеет стабильную экспрессию и обладает высоким числом копий мРНК [14, 15]. При проведении обратной транскрипции препарата тотальной РНК происходит обратная транскрипция и Rbcl, что позволяет впоследствии использовать его в качестве внутреннего контроля. Данный ген часто используется как внутренний контроль в составе различных мультиплексных наборов для контроля амплификации [16-18].

Цель данного исследования – отработать метод идентификации вируса шарки сливы при использовании дуплекса с внутренним контролем амплификации.

Объекты и методы исследований. Материалом для данного исследования послужили листья растений сливы домашней сорта Кабардинская ранняя (*Prunu domestica* L.), собранные в начале и конце мая в г. Краснодаре (Краснодарский край). Листья отбирали с каждого дерева и помещали в пакеты типа zip-lock, после чего транспортировали до места хранения при температуре +4...+10 °С. Образцы хранили от 1-го дня до недели при температуре $\approx$ -80 °С, после чего проводили выделение препарата тотальной РНК. Качество выделенной РНК анализировали с использованием методов фотометрии и гель-электрофореза в денатурирующих условиях [19].

Обратную транскрипцию и мультиплексную полимеразную цепную реакцию проводили по протоколу согласно работе Sanchez-Navarro J. A. с соавторами [20]. Амплификацию проводили с использованием коммерческих наборов 5X ScreenMix (Евроген, Россия) и Multiplex PCR Kit (QIAGEN, Нидерланды), в следующих режимах: активация и денатурация

95 °С, 10 мин, с последующими 40 циклами трёхэтапной амплификации: денатурация 95 °С, градиентный отжиг 50-62 °С, 40 сек с рампой в 3,18 °С/сек, 72 °С, 1 мин и финальная элонгация при 72 °С в течение 10 мин. Использовали праймерные пары для идентификации вируса и для внутреннего положительного контроля: PPV-F: CAATAAAGCCATTGTTGGATC; PPV-R: CTCTGTGTCCTCTTCTTGTG; Rbcl-F: TACTTGAACGCTACTGCAG; Rbcl-R: CTGCATGCATTGCACGGTG. Для анализа качества праймерных пар использовали следующие программы: Primer-BLAST (NCBI, США); TmCalculator (Promega, США); UGENE (Unipro, Россия). Детекцию продуктов амплификации проводили в 2 % агарозном геле.

Обсуждение результатов. Исследование проводили на 10 растениях сорта Кабардинская ранняя, имеющих симптомы PPV. Выделенную РНК анализировали методом фотометрии и методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях. Показатели качества препаратов РНК изучаемых растений по соотношениям экстинкции 280/260нм и 260/230 нм варьировали от 1,9 до 2,5, что являлось достаточным показателем для проведения анализа. Соотношение полос 18S к 28S РНК было оптимальным для всех образцов.

ПЦР проводили в нескольких вариантах: с градиентным отжигом праймеров и при оптимальной температуре отжига праймеров (50 °С). Также параллельно была проведена ПЦР для каждой пары праймеров в отдельной пробирке. Для определения оптимальной концентрации праймерных пар для анализа использовали различное соотношение и концентрацию праймерных пар в смеси. В немультимплексном варианте ПЦР проходила при соотношении PPV-F и PPV-R 1:1 и конечной концентрации праймеров 0,25 пкм на реакцию (рис. 1).

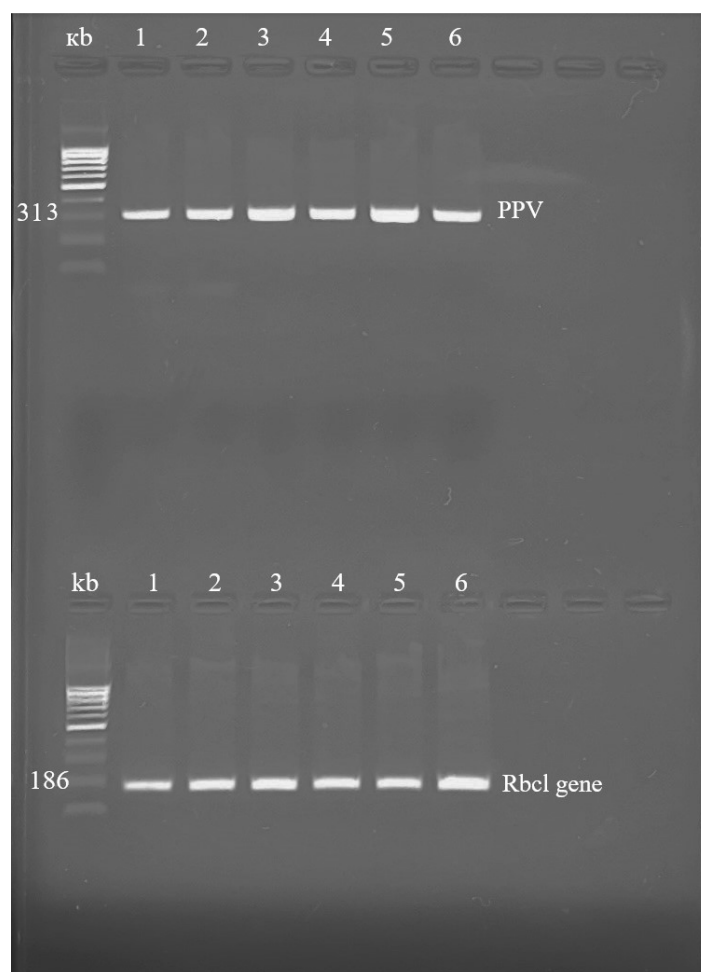


Рис. 1. Отдельная амплификация праймерных пар PPV-F, PPV-R Rbcl-F, Rbcl-R: PPV–продукт характерный для PPV; Rbcl – продукт, характерный для внутреннего контроля

Для проведения мультиплексной ПЦР использовали соотношение праймерных пар 1:1. Конечная концентрация составила 0,5 пкм на реакцию. При проведении первой серии ПЦР с оптимальной температурой для отжига обеих пар праймеров происходил отжиг лишь одной пары – Rbcl-F и Rbcl-R, а праймерные пары PPV-F и PPV-R при такой температуре не отжигались. Вероятно, это связано с более высокой температурой плавления для пары праймеров PPV-F и PPV-R, которая составила 56 °С.

При проведении ПЦР с градиентным отжигом от 50 до 62 °С средняя температура составила 56 °С с поднятием температуры 3,18 °С/сек. Такая скорость изменения температуры была выбрана во избежание возникнове-

ния неспецифических продуктов в процессе амплификации. Соотношение праймерных пар было также 1:1 – Rbcl-F, Rbcl-R к PPV-F, PPV-R, как и конечная концентрация в 0,5 пкм на реакцию (рис. 2).



Рис. 2. Результаты мультиплексной ПЦР с разведением 10 – 100 нг/мкл

С целью определения пределов чувствительности анализа, производили серию разбавления матрицы кДНК от 100 – 10 нг/мкл. Наиболее оптимальным разбавлением была концентрация в 50 нг/мкл, при более низких концентрациях полосы продуктов были тусклыми и размытыми, а при концентрации в 10 нг/мкл продукты, характерные для PPV, в некоторых образцах вовсе не определялись.

Выводы. Таким образом, вирус шарки сливы был диагностирован во всех исследуемых образцах симптоматизированного материала. Для проведения мультиплексной ПЦР с исследуемыми праймерными парами необходимо использовать градиентный отжиг праймеров с изменением температуры в 3,18 °C/сек. При использовании матрицы кДНК меньше, чем

50 нг/мкл, возможно снижение качества ПЦР. Была отработана и модифицирована методика диагностики вируса шарки сливы с использованием внутреннего контроля амплификации.

Литература

1. Упадышев М. Т. и др. Изучение вредоносных вирусов в насаждениях косточковых культур в Центральном регионе России // Селекция и сорторазведение садовых культур. 2019. Т. 6. № 2. С. 90-92.
2. 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. Vol. 33. №.1. P. 66-77. DOI: 10.1094/MPMI-06-19-0152-FI
3. Hazir A., Yurtmen M., Fidan H. Potential aphid (*Hemiptera: Aphididae*) vectors of Plum-pox virus (virus: Potyviridae) and status of Sharka disease in stone fruit orchards in the East Mediterranean region of Turkey // Journal of Agricultural Sciences. 2021. Vol. 27. №. 4. P. 484-492. DOI: 10.15832/ankutbd.722483
4. Приходько Ю. Н. и др. Распространенность вирусных болезней косточковых культур в Европейской части России // Сельскохозяйственная биология. 2008. Т. 1. С. 26-32.
5. Maiss E. et al. The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA // Journal of General Virology. 1989. Vol. 70. №. 3. P. 513-524. DOI: 10.1099/0022-1317-70-3-513
6. 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. Vol. 105. №. 11. P. 3474-3480. DOI: 10.1094/PDIS-09-20-1936-RE
7. Федорин Д. Н., Чуйкова В. О., Епринцев А. Т. Модификация методики выделения микроРНК из растений фенол-хлороформной экстракцией с применением полиэтиленгликоля 1500 // Сорбционные и хроматографические процессы. 2022. Т. 22. № 6. С. 885-892. DOI: 10.17308/sorpchrom.2022.22/10895
8. Мурган О. К., Казакова А. Д., Ефимова М. В. Сравнение методов экстракции РНК из растения картофеля для проведения ПЦР в реальном времени // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2020. №. 51. С. 123-140. DOI: 10.17223/19988591/51/7
9. Beaver-Kanuya E., Harper S.J. Development of RT-qPCR assays for the detection of three latent viruses of pome // Journal of virological methods. 2020. Vol. 278. 113836. DOI: 10.1016/j.jviromet.2020.113836
10. Плотников В. К., Насонов А. И., Салфетников А. А. Молекулярная Физиология Зерновых Культур Краснодарского Края // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2022. №. 178. С. 160-184. DOI: 10.21515/1990-4665-178-013
11. Die J.V., Román B. RNA quality assessment: a view from plant qPCR studies // Journal of experimental botany. 2012. Vol. 63. №. 17. P. 6069-6077. DOI: 10.1093/jxb/ers276
12. Juszczak I., Bartels D. LEA gene expression, RNA stability and pigment accumulation in three closely related *Linderniaceae* species differing in desiccation tolerance // Plant Science. 2017. Vol. 255. P. 59-71. DOI: 10.1016/j.plantsci.2016.10.003

13. Gasic I., Boswell S.A., Mitchison T.J. Tubulin mRNA stability is sensitive to change in microtubule dynamics caused by multiple physiological and toxic cues // PLoS biology. 2019. Vol. 17. №. 4. e3000225. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000225
14. Lin M. T. et al. A procedure to introduce point mutations into the Rubisco large subunit gene in wild-type plants // The Plant Journal. 2021. Vol. 106. №. 3. P. 876-887. DOI: 10.1111/tbj.15196
15. Berry J.O., Mure C.M., Yerramsetty P. Regulation of Rubisco gene expression in C4 plants // Current Opinion in Plant Biology. 2016. Vol. 31. P. 23-28. DOI: 10.1016/j.pbi.2016.03.004
16. 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. Vol. 111. №. 1. P. 77-84. DOI: 10.1007/s10658-004-1422-y
17. Canales C., Morán F., Olmos A., Ruiz-García A.B. First detection and molecular characterization of Apple stem grooving virus, apple chlorotic leaf spot virus, and apple hammerhead viroid in loquat in Spain // Plants. 2021. Vol. 10. №. 11. 2293. DOI: 10.3390/plants10112293
18. Manenti D.C. et al. Serological and Molecular Detection of Latent Viruses in the Apple Germplasm Bank of Santa Catarina // Brazilian Archives of Biology and Technology. 2020. Vol. 63. e20190272. DOI: 10.1590/1678-4324-2020190272
19. Subr Z., Pittnerova S., Glasa M. A simplified RT-PCR-based detection of recombinant Plum pox virus isolates // Acta virologica. 2004. Vol. 48. №. 3. P. 173-176.
20. Imbeaud S. et al. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces // Nucleic acids research. 2005. Vol. 33. №. 6. e56. DOI: 10.1093/nar/gni054

References

1. Upadyshev M.T. et al. The study of harmful viruses on stone cultures in Central region of Russia // Breeding and varietal breeding of horticultural crops. 2019. Vol. 6. №. 2. P. 90-92. (in Russian)
2. 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. Vol. 33. №.1. P. 66-77. DOI: 10.1094/MPMI-06-19-0152-FI
3. Hazir A., Yurtmen M., Fidan H. Potential aphid (*Hemiptera: Aphididae*) vectors of Plum-pox virus (virus: Potyviridae) and status of Sharka disease in stone fruit orchards in the East Mediterranean region of Turkey // Journal of Agricultural Sciences. 2021. Vol. 27. №. 4. P. 484-492. DOI: 10.15832/ankutbd.722483
4. Prikhodko Y. N. et al. Distribution of viral diseases of stone fruits in European part of Russia // Agricultural Biology. 2008. Vol. 1. P. 26-32. (in Russian)
5. Maiss E. et al. The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA // Journal of General Virology. 1989. Vol. 70. №. 3. P. 513-524. DOI: 10.1099/0022-1317-70-3-513
6. 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. Vol. 105. №. 11. P. 3474-3480. DOI: 10.1094/PDIS-09-20-1936-RE
7. Fedorin D. N., Chuikova V. O., Eprintsev A. T. Modification of the method for isolating of miRNAs from plants phenol-chloroform extraction using polyethylene glycol 1500 // Sorption and Chromatography Processes. 2022. Vol. 22. №. 6. P. 885-892. DOI: 10.17308/sorpchrom.2022.22/10895 (in Russian)

8. Murgan O. K., Kazakova A. D., Efimova M. V. Comparison of methods for RNA extraction from potato plants for real-time PCR // Toms State University Journal of Biology. 2020. №. 51. P. 123-140. DOI: 10.17223/19988591/51/7 (in Russian)
9. Beaver-Kanuya E., Harper S.J. Development of RT-qPCR assays for the detection of three latent viruses of pome // Journal of virological methods. 2020. Vol. 278. 113836. DOI: 10.1016/j.jviromet.2020.113836
10. Plotnikov V.K., Nasonov A.I., Salfetnikov A.A. Molecular Physiology of Grain Crops in the Krasnodar Region // Polythematic online Scientific Journal of Kuban State Agrarian University. 2022. №. 178. P. 160-184. DOI: 10.21515/1990-4665-178-013 (in Russian)
11. Die J.V., Román B. RNA quality assessment: a view from plant qPCR studies // Journal of experimental botany. 2012. Vol. 63. №. 17. P. 6069-6077. DOI: 10.1093/jxb/ers276
12. Juszczak I., Bartels D. LEA gene expression, RNA stability and pigment accumulation in three closely related *Linderniaceae* species differing in desiccation tolerance // Plant Science. 2017. Vol. 255. P. 59-71. DOI: 10.1016/j.plantsci.2016.10.003
13. Gasic I., Boswell S.A., Mitchison T.J. Tubulin mRNA stability is sensitive to change in microtubule dynamics caused by multiple physiological and toxic cues // PLoS biology. 2019. Vol. 17. №. 4. e3000225. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000225
14. Lin M. T. et al. A procedure to introduce point mutations into the Rubisco large subunit gene in wild-type plants // The Plant Journal. 2021. Vol. 106. №. 3. P. 876-887. DOI: 10.1111/tpj.15196
15. Berry J.O., Mure C.M., Yerramsetty P. Regulation of Rubisco gene expression in C4 plants // Current Opinion in Plant Biology. 2016. Vol. 31. P. 23-28. DOI: 10.1016/j.pbi.2016.03.004
16. 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. Vol. 111. №. 1. P. 77-84. DOI: 10.1007/s10658-004-1422-y
17. Canales C., Morán F., Olmos A., Ruiz-García A.B. First detection and molecular characterization of Apple stem grooving virus, apple chlorotic leaf spot virus, and apple hammerhead viroid in loquat in Spain // Plants. 2021. Vol. 10. №. 11. 2293. DOI: 10.3390/plants10112293
18. Manenti D.C. et al. Serological and Molecular Detection of Latent Viruses in the Apple Germplasm Bank of Santa Catarina // Brazilian Archives of Biology and Technology. 2020. Vol. 63. e20190272. DOI: 10.1590/1678-4324-2020190272
19. Subr Z., Pittnerova S., Glasa M. A simplified RT-PCR-based detection of recombinant Plum pox virus isolates // Acta virologica. 2004. Vol. 48. №. 3. P. 173-176.
20. Imbeaud S. et al. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces // Nucleic acids research. 2005. Vol. 33. №. 6. e56. DOI: 10.1093/nar/gni054