

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 578.856.2

АНАЛИЗ ПОЛНЫХ ГЕНОМОВ ВИРУСА АСПЕРМИИ ТОМАТА
УКАЗЫВАЕТ НА РЕАССОРТАЦИЮ В РОССИЙСКИХ ИЗОЛЯТАХ
ВИРУСА ИЗ ХРИЗАНТЕМЫ

© 2023 г. А. А. Шевелева^а, Г. С. Краснов^б, А. В. Кудрявцева^б, А. В. Снежкина^б,
Е. В. Булавкина^б, С. Н. Чирков^{а, с, *}

^аБиологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
Москва, 119234 Россия

^бИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

^сКурчатовский геномный центр — Никитский ботанический сад — Национальный научный центр
Российской академии наук, Ялта, 298648 Россия

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

Поступила в редакцию 13.02.2023 г.

После доработки 05.04.2023 г.

Принята к публикации 13.04.2023 г.

Вирус аспермии томата (tomato aspermy virus, TAV, род *Cuscutovirus*, семейство Bromoviridae) — один из самых распространенных и вредоносных вирусов хризантемы, вызывающий деформацию, измельчание и обесцвечивание соцветий. Метатранскриптомное секвенирование растений хризантемы сортов Ribonette и Golden Standard из коллекции Никитского ботанического сада (Ялта, Республика Крым) выявило присутствие нуклеотидных последовательностей вирусов, родственных TAV. На основе этих данных впервые собраны полные геномы двух российских изолятов этого вируса. Сегментированный геном этих вирусов представлен тремя молекулами одноцепочечной линейной РНК положительной полярности длиной 3412 (РНК1), 3097 (РНК2) и 2219 (РНК3) нуклеотидов, что типично для кукумовирусов. Идентифицированы пять открытых рамок считывания (ORF), которые кодируют репликазу (ORF1), РНК-зависимую РНК-полимеразу (ORF2a), белок-супрессор сайленсинга (ORF2b), транспортный белок (ORF3a) и белок оболочки вируса (ORF3b). Идентичность геномов TAV, выделенных из двух сортов хризантемы, составила 99.8% для всех трех вирусных РНК, а с другими изолятами TAV из Genbank — 97.5–99.7 (РНК1), 93.8–99.8 (РНК2) и 89.3–99.3% (РНК3). Филогенетический анализ показал, что РНК1 и РНК3 российских изолятов вируса входят в гетерогенные группы изолятов TAV, обнаруженных на различных видах растений в разных регионах мира. В то же время, РНК2 четко кластеризуется с томатными изолятами SKO20ST2 из Словении и PV-0220 из Болгарии и, в меньшей степени, с иранским изолятом Ker.Mah.P из растений петунии и китайским изолятом Непан из растений хризантемы. Различный порядок ветвления филогенетических деревьев, реконструированных по разным сегментам вирусного генома, указывает на псевдорекомбинацию (реассортацию) в российских изолятах TAV.

Ключевые слова: вирусы растений, вирус аспермии томата, хризантема, высокопроизводительное секвенирование, реассортация

DOI: 10.31857/S0026898423050166, **EDN:** EIBXVH

ВВЕДЕНИЕ

Хризантема (*Chrysanthemum* spp., семейство Asteraceae) — одно из самых популярных цветочно-декоративных растений во всем мире. Вирусные и виroidные болезни существенно снижают декоративные свойства растений и качество вегетативно размножаемого материала [1–3]. Из примерно трех десятков вирусов и виroidов, обнаруженных в растениях хризантемы, вирус аспермии томата является одним из самых распространенных и вредоносных, вызывая деформацию, измельчание и обесцвечивание соцветий [4, 5].

Вирус аспермии томата (tomato aspermy virus, TAV) принадлежит к роду *Cuscutovirus* из семейства Bromoviridae. Род *Cuscutovirus* включает четыре вида: собственно TAV, а также вирус огуречной мозаики (cucumber mosaic virus, CMV), вирус карликовости арахиса (peanut stunt virus, PSV) и вирус мягкой крапчатости лиатриса (gayfeather mild mottle virus, GfMMV) [6]. Как у всех представителей этого рода, геном TAV сегментирован и состоит из трех молекул одноцепочечной линейной РНК положительной полярности, каждая из которых упакована в отдельные вирусные части-

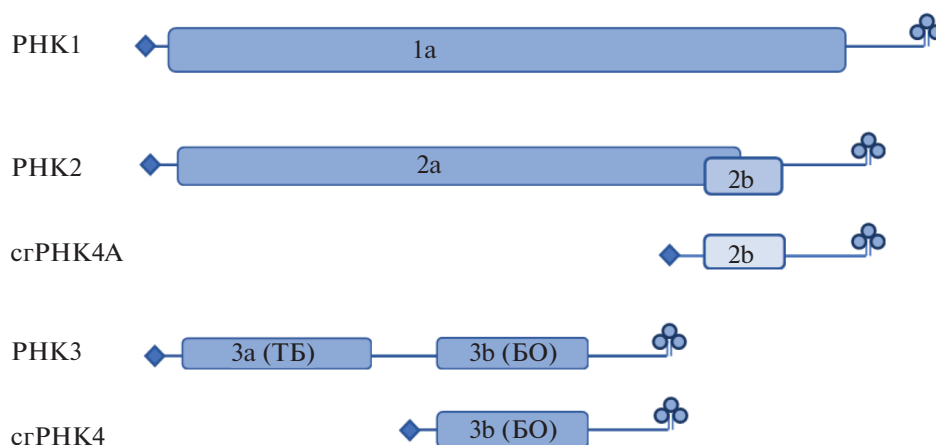


Рис. 1. Схема генома вируса аспермии томата. Прямоугольниками показаны открытые рамки считывания 1a, 2a, 2b, 3a и 3b, а тонкой линией — нетранслируемые участки генома. ТБ — транспортный белок. БО — белок оболочки. сгРНК — субгеномная РНК. — тРНК-подобная структура, — кеп.

цы диаметром 28 нм. 5'-концы РНК кепированы, а 3'-концевые последовательности организованы в тРНК-подобную структуру. Пять открытых рамок считывания (open reading frame, ORF) кодируют репликазу (ORF1), РНК-зависимую РНК-полимеразу (ORF2a), полифункциональный белок 2b (ORF2b), транспортный белок (ТБ) (ORF3a) и белок оболочки (БО) вируса (ORF3b) (рис. 1). Репликаза и РНК-зависимая РНК-полимераза обеспечивают репликацию вирусного генома. Белок 2b является репрессором сайленсинга, а также играет важную роль в системном транспорте вируса, индукции симптомов и патогенезе вирусной инфекции. ТБ обеспечивает межклеточный транспорт вируса, а БО — инкапсидацию вирусного генома, перенос вируса тлями и его распространение по растению. ORF1, ORF2a и ORF3a транслируются с геномной РНК, а ORF3b и ORF2b — с субгеномных РНК4 и РНК4А соответственно [7].

TAV распространен повсеместно. Основными природными хозяевами являются растения хризантемы и томата. Вирус встречается также в растениях петунии, гладиолуса, настурции, циннии, канны, лилии и перца [8, 9]. Круг экспериментальных хозяев этого вируса значительно шире, он включает более 100 видов двудольных и однодольных растений из 27 семейств. TAV распространяется при вегетативном размножении зараженных растений и непersistентным образом тлями [10].

В России TAV впервые был обнаружен на хризантеме *Ch. indicum* в Приморском крае [11]. Геном дальневосточного изолята вируса не изучен. Несколько новых российских изолятов TAV выявлены в Никитском ботаническом саду (НБС) на трех сортах хризантемы местной селекции [12]. Гены БО TAV из сортов Симфония, Юность и ги-

брида 7-15 оказались полностью идентичными между собой, а также БО венгерского изолята P-TAV (L15335) из перца [9] и австралийского изолята V-TAV (AJ277268) из хризантемы [13].

Кроме того, при метатранскриптомном анализе растений интродуцированных сортов Ribonette и Golden Standard хризантемы из коллекции НБС получены прочтения, родственные карлавирусам хризантемному вирусу В (chrysanthemum virus В) и хризантемному вирусу R (chrysanthemum virus R), а также TAV. Полноразмерные геномы обоих карлавирусов собраны и охарактеризованы ранее [14]. Целью данной работы была сборка и анализ полных геномов двух изолятов TAV.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объект исследования. Листья хризантемы (*Ch. morifolium* Ramat.) сортов Ribonette и Golden Standard с симптомами предполагаемой вирусной инфекции собирали в генофондовой коллекции хризантемы Никитского ботанического сада — Национального научного центра РАН (НБС), Ялта, Республика Крым, в 2018–2019 годах.

ОТ-ПЦР. Суммарную РНК выделяли с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit (“Qiagen”, Германия). Первую нить кДНК синтезировали с использованием обратной транскриптазы MMLV и рассеянной затравки в виде случайных гексамеров (“Евроген”, Россия). Для выявления TAV в растительном материале использовали ОТ-ПЦР. Ген БО TAV амплифицировали с помощью прямых и обратного вирусспецифических праймеров (5'-ATGGCCCAAAACGGTACGGGAGGAG-3' и 5'-TCACACCGGGAGCGTTGAAGCGGAA-3' соответственно) [15], используя ДНК-полимеразу Epcyclo (“Евроген”) и 35 циклов ПЦР (денатура-

ция — 94°C, 30 с; отжиг — 52°C, 30 с; элонгация — 72°C, 1 мин) с окончательной достройкой при 72°C в течение 10 мин. В качестве положительно-го контроля использовали изолят TAV из растений хризантемы сорта Юность. Отрицательным контролем служил образец хризантемы сорта Сказка, не зараженный этим вирусом [12]. Ампликоны разделяли электрофорезом в 1× TAE-буфере (“Thermo Scientific”, США) в присутствии бромистого этидия и фотографировали в ультрафиолетовом свете с помощью гель-документирующей системы Multi-Doc-It (UVP, Великобритания). В качестве маркера размера продуктов ПЦР использовали препарат 100+ bp DNA ladder (“Евроген”). Продукты ПЦР секвенировали с прямого и обратного праймеров в фирме “Евроген”.

Высокопроизводительное секвенирование (HTS). Библиотеки кДНК для секвенирования геномов TAV получали на матрице полиаденилированной РНК, выделенной из листьев хризантемы сортов Ribonette и Golden Standard с помощью набора K0600 (“Силекс”, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Библиотеки синтезировали с помощью набора TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (“Illumina”, США) и секвенировали на платформе Illumina MiSeq в Центре коллективного пользования “Геном” Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН. Полученные парноконцевые прочтения длиной 150 нуклеотидов обрезали и фильтровали с помощью Trimmomatic v.0.39 [16]. Контиги собирали *de novo* с помощью программы Trinity 2.11, используя настройки по умолчанию [17]. Вирусные контиги идентифицировали путем картирования всех собранных контигов на базу полноразмерных вирусных геномов из GenBank (https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/genbank/viral/assembly_summary.txt, всего около 50000 геномов) при помощи локальной версии BLASTn 2.13. Полученные прочтения картировали на контиги TAV, собранные в образце Rib, с помощью программы BWA [18]. Поиск точечных замен и коротких инделей в прочтениях осуществляли при помощи программы freeBayes [19]. Прочтения ряда близкородственных изолятов TAV, доступных в GenBank, моделировали путем многократной случайной “нарезки” их геномов на фрагменты длиной 150 нуклеотидов с помощью программы wgsim [20]. С этой целью были выбраны изоляты PV-0220 и SKO20ST2, которые имели высокую гомологию с российскими изолятами Rib и GS по всем геномным РНК (99.5–99.8% идентичности), и PV-0068, идентичный на 99.5–99.8% по РНК1 и РНК3 и на 95.6% по РНК2.

Анализ последовательностей. Последовательности, наиболее близкие к собранным геномам TAV, выявляли с помощью веб-версии BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) на нуклеотидной коллекции NCBI. Множественные вы-

равнивания нуклеотидных и аминокислотных (aa) последовательностей, определение степени их идентичности и филогенетический анализ выполняли в MEGA7 [21]. Филогенетические деревья реконструировали методом присоединения соседей (neighbor joining). ORF в вирусных геномах идентифицировали с помощью программы ORF finder (<https://ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>). Консервативные домены в вирусных белках локализовали посредством поиска по базе Conserved Domain Database (CDD, <https://ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). Для поиска событий рекомбинации использовали программу RDP4.46 [22] с настройками по умолчанию, за тем исключением, что была выбрана опция “sequences are linear”.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диагностика TAV с помощью ОТ-ПЦР

При метатранскриптомном секвенировании образцов хризантемы сортов Ribonette и Golden Standard были выявлены прочтения, родственные TAV [14]. Присутствие вируса в этих образцах подтверждали независимым методом, используя с этой целью ОТ-ПЦР с вирусспецифическими праймерами. В обоих случаях получили продукты ПЦР ожидаемого размера 657 п.н. (результаты не представлены). Последовательность гена БО изолята из сорта Golden Standard оказалась полностью идентичной БО изолятов V-TAV (AJ277268), ChJ (LC634033), PV-0312 (OL311687), Yunost (MH678705) из растений хризантемы и P-TAV (L15335) из растений перца. Ближайшими родственниками гена БО изолята TAV из сорта Ribonette (99.7% идентичности) были японские изоляты H9 (LC380674) из растений хризантемы и G1 (LC380671) из томата [23]. Таким образом, результаты ОТ-ПЦР подтвердили присутствие TAV в растениях сортов Ribonette и Golden Standard и показали высокую консервативность гена БО у изолятов TAV из различных источников.

Сборка и характеристика полноразмерных геномов TAV

В результате секвенирования образцов кДНК хризантемы сортов Ribonette и Golden Standard получено, соответственно, 12.4 и 26.6 млн парноконцевых прочтений длиной 150 п.н., из которых 0.8% (Ribonette) и 7.9% (Golden Standard) картировались на геном TAV. Из этих прочтений собраны полные геномы двух изолятов вируса, обозначенных Rib и GS сообразно названиям сортов хризантемы, в которых они были обнаружены. Длина РНК1 обоих изолятов составила 3412 нуклеотидов, РНК2 — 3097 нуклеотидов, а РНК3 — 2219 нуклеотидов, что в целом соответствует длине геномных РНК изолятов TAV, депонированных в GenBank (табл. 1). Изоляты Rib и GS оказа-

Таблица 1. Изоляты вируса аспермии томата, полногеномные последовательности которых представлены в GenBank и определены в данной работе

Изолят/ штамм	Культура/ Вид растения	Страна	Номер РНК	Длина РНК, нуклеотиды	Номер в GenBank
H9	Хризантема	Япония	РНК1	3415	LC380672
			РНК2	3097	LC380673
			РНК3	2224	LC380674
G1	Томат	Япония	РНК1	3414	LC380669
			РНК2	3070	LC380670
			РНК3	2224	LC380671
PV-0068	Томат	Нет данных	РНК1	3414	MW582782
			РНК2	3077	MW582783
			РНК3	2225	MW582784
Go34	Томат	Япония	РНК1	3413	LC380675
			РНК2	3097	LC380676
			РНК3	2222	LC380677
PV-0312	Хризантема	Германия	РНК1	3413	OL311685
			РНК2	3104	OL311686
			РНК3	2224	OL311687
KC-TAV	Хризантема	Южная Корея	РНК1	3412	AJ320273
			РНК2	3074	AJ320274
			РНК3	2222	AJ237849
ChJ	Хризантема	Япония	РНК1	3412	LC634031
			РНК2	3099	LC634032
			РНК3	2224	LC634033
pt058	Хризантема	Китай	РНК1	3412	MN841291
			РНК2	3068	MN841292
			РНК3	2416	MN841293
V-TAV	Хризантема	Австралия	РНК1	3410	D10044
			РНК2	3074	D10663
			РНК3	2389	L79972
BJ	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Китай	РНК1	3409	HQ424163
			РНК2	3023	HQ424164
			РНК3	2216	HQ424165
Henan	Хризантема	Китай	РНК1	3409	KF432413
			РНК2	3096	KF432414
			РНК3	2222	KF432415

Таблица 1. Окончание

Изолят/ штамм	Культура/ Вид растения	Страна	Номер РНК	Длина РНК, нуклеотиды	Номер в GenBank
PV-0220	Томат	Болгария	РНК1	3409	MW080947
			РНК2	3097	MW080948
			РНК3	2224	MW080949
SKO20ST2	Томат	Словения	РНК1	3409	OL472069
			РНК2	3097	OL472070
			РНК3	2332	OL472071
VRS 321	Нет данных	Канада	РНК1	3407	OK558774
			РНК2	3073	OK558776
			РНК3	2374	OK558778
Till	Нет данных	США	РНК1	3407	OK558775
			РНК2	3072	OK558777
			РНК3	2377	OK558779
Ker.Mah.P	Петуния	Иран	РНК1	3351	KT757538
			РНК2	3035	KT757537
			РНК3	2192	KT757536
GS	Хризантема	Россия	РНК1	3412	OP924357
			РНК2	3097	OP924358
			РНК3	2219	OP924359
Rib	Хризантема	Россия	РНК1	3412	OP924360
			РНК2	3097	OP924361
			РНК3	2219	OP924362

лись очень близки между собой: их РНК1, РНК2 и РНК3 идентичны на 99.8, 99.7 и 99.8% соответственно. Идентичность TAV Rib и GS с другими известными изолятами составила 97.5–99.7 (РНК1), 93.8–99.8 (РНК2) и 89.3–99.3% (РНК3). Согласно результатам BLASTn, самыми близкими к Rib и GS являются изоляты PV-0068 из растений томата и ChJ из хризантемы (РНК1), SKO20ST2 из растений томата (РНК2), а также PV-0068 из томата и ChJ из хризантемы (РНК3). Полноразмерные геномы изолятов Rib и GS депонированы в GenBank под номерами OP924357–OP924362. Следует отметить, что последовательности гена БО изолятов Rib и GS, определенные методом Сэнгера и с помощью метатранскриптомного секвенирования, оказались идентичными.

В геномах Rib и GS идентифицированы пять ORF. ORF1 расположена в РНК1 и кодирует бе-

лок 1a (вирусную репликазу) длиной 993 aa. Размер ORF1 (2982 нуклеотида) в точности соответствует длине этой ORF у других изолятов TAV, депонированных в GenBank. Домены метилтрансферазы и хеликазы находятся в позициях 49–406 и 711–975 белка 1a соответственно. ORF2a локализована в РНК2, состоит из 2487 нуклеотидов (как у всех других известных изолятов TAV) и кодирует белок 2a (РНК-зависимую РНК-полимеразу) из 828 aa. ORF1 и ORF2a изолятов Rib и GS идентичны соответствующим рамкам считывания других изолятов TAV на 98.3–99.9 и 95.6–99.8%.

ORF2b изолятов Rib и GS длиной 315 нуклеотидов также локализована в РНК2, частично перекрывается с ORF2a, находясь в другой рамке считывания, и кодирует полифункциональный белок 2b размером 104 aa. Такие размеры характерны примерно для двух третей изолятов TAV,

депонированных в GenBank. Однако у многих изолятов вируса ген этого белка значительно короче за счет протяженных (24–27 нуклеотидов) делеций в 3'-концевом участке ORF2b (MW841292, LC380670, AJ320274, D10663) или вследствие более проксимальной локализации терминирующего TGA-кодона (MW582783), или по обеим причинам (HQ424164). В целом, ORF2b TAV идентичны на 88.2–100% на нуклеотидном и 79.4–100% на аминокислотном уровнях. ORF2b изолятов Rib и GS идентичны их аналогу у других изолятов TAV на 88.9–100 и 88.2–99.1% на нуклеотидном и на 79.4–100% на аминокислотном уровнях соответственно.

ORF3a и ORF3b находятся в РНК3 и разделены нетранслируемой последовательностью длиной 295 нуклеотидов. ORF3a изолятов Rib и GS (843 нуклеотида) кодирует ТБ из 280 аа, как у большинства известных изолятов TAV. У нескольких изолятов (EU163410, EU163411, KT757536, L79972, MW582784, OL311687), выделенных из растений хризантемы, петунии и томата, ORF3a короче (741 нуклеотид) в силу того, что трансляция начинается со второго инициаторного ATG-кодона, который расположен дистальней на 102 нуклеотида от 5'-конца РНК3, чем у большинства изолятов вируса [13, 23, 24]. ORF3a TAV идентичны на 95.9–100% на нуклеотидном и 89.7–100% на аминокислотном уровнях. ORF3a изолятов Rib и GS идентичны гену ТБ других TAV на 96.5–99.9 и 96.8–100% на нуклеотидном и на 92.8–99.6 и 92.8–100% на аминокислотном уровнях соответственно.

ORF3b изолятов Rib и GS длиной 657 нуклеотидов кодирует БО размером 218 аа. Такие размеры имеют практически всех известные изоляты TAV. У изолятов BJ (HQ424165) и TAV-C (D01015) из растений хризантемы ORF3b длиннее (690 нуклеотидов) из-за того, что делеция одного нуклеотида приводит к сдвигу рамки считывания, и терминирующий TGA кодон оказывается ближе к 3'-концу РНК3, чем у других изолятов вируса. ORF3b TAV идентичны на 95.1–100% на нуклеотидном и 94.0–100% на аминокислотном уровнях. ORF3b изолятов Rib и GS идентичны гомологичному участку генома других TAV на 95.9–99.7 и 96.3–99.5% на нуклеотидном и на 96.4–100 и 96.8–100% на аминокислотном уровнях соответственно.

ORF фланкированы нетранслируемыми участками (UTR) длиной 94, 87 и 85 нуклеотидов на 5'-конце и 336, 336 и 339 нуклеотидов на 3'-конце РНК1, РНК2 и РНК3 соответственно. 3'-UTR РНК1, РНК2 и РНК3 у обоих изолятов TAV весьма консервативны: они идентичны на 96.2–98.3%, а последние 104 нуклеотида трех геномных РНК полностью идентичны. 5'-UTR РНК3 длиной 32–75 нуклеотидов состоит из повторяющихся TG-динуклеотидов. Этот участок из 42 нуклео-

тидов характерен для всех известных РНК3 TAV [13, 23].

Таким образом, по организации генома и размерам ORF российские изоляты TAV из растений хризантемы близки к большинству изолятов вируса независимо от их географической локализации и вида растения-хозяина.

Филогенетический анализ полных геномов TAV

В филогенетическом анализе (рис. 2) были использованы все изоляты TAV, полногеномные последовательности которых депонированы в GenBank и определены в данной работе (табл. 1). Показано, что РНК1 Rib и GS входит в гетерогенную группу изолятов, найденных в растениях томата и хризантемы в Японии, Южной Корее, Болгарии, Германии, США, Канаде и Австралии (рис. 2a). РНК2 изолятов Rib и GS четко кластеризуется с томатными изолятами SKO20ST2 из Словении и PV-0220 из Болгарии и, в меньшей степени, с иранским изолятом Ker.Mah.P из петунии и китайским изолятом HenaP из хризантемы (рис. 2б). Подобно РНК1, РНК3 российских изолятов TAV также входит в состав обширной группы изолятов этого вируса, обнаруженных на различных видах растений в разных регионах мира (рис. 2в).

Очевидно, что три дерева, реконструированные по последовательностям РНК1, РНК2 и РНК3, имеют разную топологию. Российские изоляты Rib и GS кластеризуются по-разному в зависимости от анализируемого сегмента генома. Различный порядок ветвления филогенетических деревьев, построенных по разным участкам вирусного генома, может указывать как на факт реассортации сегментов генома, так и на наличие рекомбинации внутри сегментов [25]. Однако анализ выравниваний РНК1, РНК2 и РНК3 изолятов TAV с помощью программы RDP4 не выявил рекомбинации в изолятах Rib и GS (данные не представлены). Не обнаружено рекомбинации и при анализе более широкого набора последовательностей, включающего, помимо TAV, полные геномы ряда изолятов других кукумовирусов: CMV, PSV и GfMMV.

Следует отметить, что деревья, построенные по РНК2 и отдельно по ORF2a и ORF2b, практически не различались между собой и были полностью идентичными по набору изолятов TAV в том кластере, в который входят Rib и GS (данные не представлены). Полученные результаты можно, вероятно, объяснить тем, что российские изоляты TAV являются псевдорекомбинантами (реассортантами), в которых РНК2, с одной стороны, и РНК1 и РНК3, с другой, происходят от разных изолятов вируса.

Таким образом, в российских изолятах TAV выявлены признаки реассортации без признаков

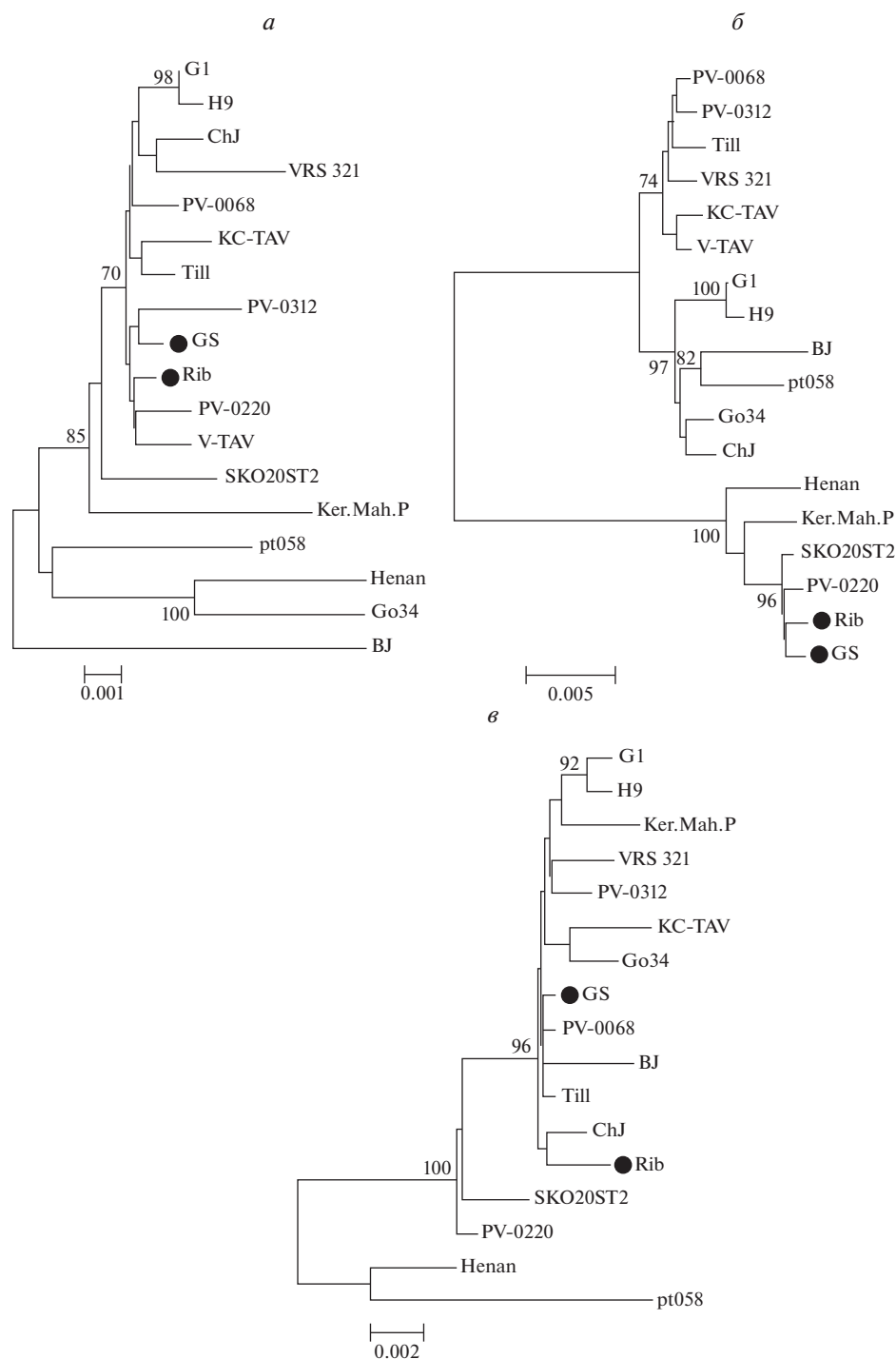


Рис. 2. Филогенетический анализ полногеномных последовательностей изолятов вируса аспермии томата (TAV). *a* – РНК1, *б* – РНК2, *в* – РНК3. Дерево реконструировано методом присоединения соседей, встроенным в MEGA7. Приведены значения бутстрэпа >70%. Названия изолятов указаны на концах ветвей. Российские изоляты Rib и GS выделены черным кружком (●).

внутригеномной рекомбинации. Кластеризации изолятов TAV по географическому принципу или по виду растения-хозяина не обнаружено.

Другое возможное объяснение могло состоять в том, что растения хризантемы были заражены двумя разными изолятами TAV, для одного из ко-

торых собраны РНК1 и РНК3, а для другого – РНК2. Для проверки этого предположения прочтения, полученные при HTS обоих образцов, картировали на собранный геном Rib, а затем проводили в них поиск точечных замен и коротких инделей. В анализ также были включены пар-

ноконцевые прочтения аналогичной длины (150 нуклеотидов), смоделированные для изолятов PV-0068, PV-0220 и SKO20ST2.

Показано, что полученные в результате HTS прочтения изолятов GS и Rib и смоделированные прочтения изолятов PV-0068, PV-0220 и SKO20ST2 одинаково успешно картировались на референсный геном Rib. Таким образом, при наличии в образцах GS и Rib контаминирующего изолята TAV со сравнимой идентичностью, его прочтения также должны были картироваться на референсный геном.

Установлено, что подавляющее число замен в прочтениях изолята GS, картирующихся на три геномных РНК Rib, имели аллельную частоту 100%, т.е. не выявлено гетерогенности ни по одной нуклеотидной позиции. Практически не было замен в прочтениях изолята Rib, картируемых на геном Rib. При смешанной инфекции двумя изолятами число замен с невысокой аллельной частотой было бы больше.

Следует отметить, что в случае более значительных различий между изолятами GS и Rib и контаминирующим вирусом при сборке *de novo* собрались бы два контига, по одному для каждого из изолятов. Однако в обоих образцах для каждой из трех РНК TAV собрался только один контиг, соответствующий геномной РНК вируса.

Таким образом, смешанная инфекция образцов GS и Rib двумя разными изолятами TAV не выявлена.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

С помощью метатранскриптомного анализа и ОТ-ПЦР TAV впервые обнаружен на растениях хризантемы сортов Golden Standard и Ribonette, интродуцированных в НБС в 1976 и в 2013 гг., соответственно, из цветоводческих хозяйств, расположенных в Симферопольском районе Республики Крым. До этого TAV выявляли только на местных сортах и гибридах хризантемы [11, 12]. Обнаружение вируса на интродуцированных сортах позволяет предположить, что вирус мог проникнуть в НБС с зараженным посадочным материалом хризантемы упомянутых сортов. Однако на сегодняшний день происхождение TAV в насаждениях НБС не установлено.

К началу нашей работы в GenBank было депонировано 16 полногеномных последовательностей изолятов TAV, обнаруженных в растениях томата, хризантемы и петунии в различных регионах мира (табл. 1). В данной работе впервые секвенированы полные геномы двух российских изолятов TAV. Установлено, что по организации генома и размерам ORF российские изоляты TAV из хризантемы близки к большинству изолятов вируса

независимо от их географической локализации и вида растения-хозяина.

Анализ полногеномных последовательностей российских изолятов TAV выявил признаки реассортации. Поскольку представители рода *Cuscutavirus* и, в частности, TAV имеют сегментированный геном, и каждая из трех геномных РНК инкапсидирована в отдельную вирусную частицу, совместное заражение растения разными изолятами вируса или разными кукумовирусами может приводить к обмену сегментами генома между ними и возникновению реассортантов в потомстве [7]. Возможность образования жизнеспособных реассортантов у кукумовирусов подтверждена экспериментально. Так, получены реассортанты между изолятами CMV, которые относятся к дивергентным подгруппам IA и II. Некоторые из них накапливались в зараженных растениях в большем количестве, чем родительские штаммы, и в силу этого могли успешно закрепляться в популяции [26]. Также получены псевдорекомбинанты, у которых РНК1 и РНК2 происходят от CMV, а РНК3 от TAV (или состоящие из РНК1 и РНК2 TAV и РНК3 CMV) [27]. Помимо экспериментальных реассортантов, выявлено и несколько природных реассортантов кукумовирусов. В Китае на растениях томата обнаружен изолят CMV, который представлял собой реассортант между подгруппами IA (РНК2) и II (РНК1 и РНК3) [28]. Известны природные реассортанты между двумя подгруппами PSV [29], а также между CMV и PSV [30]. Таким образом, разные сегменты генома кукумовирусов потенциально могут иметь разную эволюционную историю. Однако в природных условиях реассортация у кукумовирусов является, по-видимому, достаточно редким событием в силу нежизнеспособности большинства геномных комбинаций, возникающих при смешанных инфекциях [26, 31, 32].

В нашей работе впервые показана возможность внутривидовой реассортации в природных изолятах TAV. Согласно результатам филогенетического анализа, РНК2 изолятов Rib и GS происходит от другого изолята, чем РНК1 и РНК3. Поскольку РНК2 Rib и GS группируется с томатными изолятами TAV, возможно, реассортация у предка (предков) российских изолятов произошла в растениях томата. Известно, что хризантема может быть резерватом TAV, откуда он с высокой эффективностью распространяется тлями на овощные и бахчевые культуры и наоборот [33].

Наряду с мутационной изменчивостью и рекомбинацией, реассортация может играть важную роль в эволюции вирусов с сегментированным геномом, повышая их приспособленность к новому хозяину и приводя к появлению новых видов вирусов [26, 32]. Например, анализ филогенетических деревьев, реконструированных по

разным сегментам генома TAV (рис. 2), показывает, что иранский изолят Ker.Mah.P из петунии [8] также, по-видимому, является реассортантом, и именно генетический сдвиг мог способствовать успешной адаптации TAV к новому виду растения-хозяина.

Авторы благодарят Н.В. Смыкову и И.В. Митрофанову за помощь в обследовании коллекции хризантемы Никитского ботанического сада — Национального научного центра РАН.

Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования РФ № 075-15-2019-1670. Высокопроизводительное секвенирование выполнено с использованием оборудования ЦКП “Геном” ИМБ РАН (http://www.eimb.ru/ru1/ckp/ccu_genome_c.php).

Настоящая статья не содержит исследований с привлечением людей или животных.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Trolinger J.C., McGovern R.J., Elmer W.H., Rechcigl N.A., Shoemaker C.M. (2018) Diseases of chrysanthemum. In: *Handbook of Florists' Crop Disease*. Eds McGovern R.J., Elmer W.H. Springer International Publ. AG, 439–502.
2. Ram R., Verma N., Singh A.K., Singh L., Hallan V., Zaidi A.A. (2005) Indexing and production of virus-free chrysanthemums. *Biologia Plantarum*. **49**, 149–152.
3. Mitrofanova I.V., Zakubanskiy A.V., Mitrofanova O.V. (2018) Viruses infecting main ornamental plants: an overview. *Ornam. Hortic*. **24**, 95–102.
4. Hollings M. (1955) Investigation of chrysanthemum viruses. I. Aspermy flower distortion. *Ann. Appl. Biol.* **43**, 86–102.
5. Закубанский А.В., Чирков С.Н., Митрофанова О.В., Митрофанова И.В. (2016) Вирусы некоторых ценных плодовых, эфиромасличных и декоративных культур. *Бюлл. Гос. Никитского бот. сада*. **121**, 7–18.
6. <https://ictv.global/report/chapter/bromoviridae/bromoviridae/cucumovirus>
7. Palukaitis P., Garcia-Arenal F. (2003) Cucumoviruses. *Adv. Vir. Res.* **62**, 241–323.
8. Maddahian M., Massumi H., Heydarnejad J., Pour A.H., Varsani A. (2017) Characterization of Iranian tomato aspermy virus isolates with a variant 2b gene sequence. *Trop. Plant Pathol.* **42**, 475–484.
9. Salanki K., Balazs E., Burgyan J. (1994) Nucleotide sequence and infectious *in vitro* transcripts of RNA3 of tomato aspermy virus pepper isolate. *Virus Res.* **33**, 281–289.
10. Hollings M., Stone O.M. (1971) Tomato aspermy virus. *CMI/AAB Description of Plant Viruses*. **79**, 1–7.
11. Чуян А.Х., Крылов А.В. (1979) Свойства вируса аспермии томатов из хризантемы и круг его хозяев в Приморском крае. *Бюлл. Гл. Ботан. Сада АН СССР*. **114**, 84–92.
12. Zakubanskiy A., Mitrofanova I., Smykova N., Mitrofanova O., Chirkov S. (2021) Detection and partial molecular characterization of viruses infecting chrysanthemum in Russia. *Acta Hortic*. **1324**, 321–327.
13. Moreno I.M., Bernal J.J., García de Blas B., Rodriguez-Cerezo E., García-Arenal F. (1997) The expression level of the 3a movement protein determines differences in severity of symptoms between two strains of tomato aspermy cucumovirus. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**, 171–179.
14. Chirkov S.N., Sheveleva A., Snezhkina A., Kudryavtseva A., Krasnov G., Zakubanskiy A., Mitrofanova I. (2022) Highly divergent isolates of chrysanthemum virus B and chrysanthemum virus R infecting chrysanthemum in Russia. *Peer J*. **10**, e12607.
15. Raj S.K., Kumar S., Choudhari S. (2007) Identification of tomato aspermy virus as the cause of yellow mosaic and flower deformation of chrysanthemums in India. *Australas. Plant Dis. Notes*. **2**, 1–2.
16. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. **30**, 2114–2120.
17. Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M., Levin J.Z., Thompson D.A., Amit I., Adiconis X., Fan L., Raychowdhury R., Zeng Q., Chen Z., Mauceli E., Hacohen N., Gnirke A., Rhind N., di Palma F., Birren B.W., Nusbaum C., Lindblad-Toh K., Friedman N., Regev A. (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.* **29**, 644–652.
18. Li H., Durbin R. (2010) Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*. **26**, 589–595.
19. <https://arxiv.org/abs/1207.3907>
20. <https://github.com/lh3/wgsm>
21. Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 1870–1874.
22. Martin D.P., Murrell B., Golden M., Khoosal A., Muhire B. (2015) RDP4: detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* **1**, vev003.
23. Inoue S., Tamura M., Ugaki M., Suzuki M. (2018) Complete genome sequences of three tomato aspermy virus isolates in Japan. *Genome Announc.* **6**, e00474–18.
24. Raj S.K., Kumar S., Choudhari S., Verma D.K. (2009) Biological and molecular characterization of three isolates of tomato aspermy virus infecting chrysanthemums in India. *J. Phytopathol.* **157**, 117–125.
25. Chare E., Holmes E. (2006) A phylogenetic survey of recombination frequency in plant RNA viruses. *Arch. Virol.* **151**, 933–946.
26. Pita J.S., Roossink M.J. (2013) Fixation of emerging interval recombination in cucumber mosaic virus populations. *J. Virol.* **87**, 1264–1269.
27. Salanki K., Carrere I., Jacquemond M., Balazs E., Tepfer M. (1997) Biological properties of pseudorecombinant and recombinant strains created with cucumber mosaic virus and tomato aspermy virus. *J. Virol.* **71**, 3597–3602.
28. Chen Y., Chen J., Zhang H., Tang X., Du Z. (2007) Molecular evidence and sequence analysis of a natural reassortant between cucumber mosaic virus subgroup IA and II strains. *Virus Genes*. **35**, 405–413.

29. Hu C.-C., Ghabrial S.A. (1998) Molecular evidence that strain BV-15 of peanut stunt cucumovirus is a reassortant between subgroup I and II strains. *Phytopathology*. **88**, 92–97.
30. White P.S., Morales F., Roossink M.J. (1995) Interspecific reassortment of genomic segments in the evolution of cucumoviruses. *Virology*. **207**, 334–337.
31. Thompson J.R., Tepfer M. (2009) The 3'-untranslated region of cucumber mosaic virus (CMV) subgroup II RNA3 arose by interspecific recombination between CMV and tomato aspermy virus. *J. Gen. Virol.* **90**, 2293–2298.
32. Jacquemond M. (2012) Cucumber mosaic virus. *Adv. Vir. Res.* **84**, 439–504.
33. Haack I., Karl E. (1986) Transmission of isolates of tomato aspermy (tomato aspermy virus) and cucumber mosaic virus (cucumber mosaic virus) by aphid species. *Arch. Phytopath. Plant Protect.* **22**, 451–458.

Analysis of the Tomato Aspermy Virus Complete Genomes Suggests Reassortment in Russian Isolates from Chrysanthemum

A. A. Sheveleva^a, G. S. Krasnov^b, A. V. Kudravytseva^b, A. V. Snezhkina^b,
E. V. Bulavkina^b, and S. N. Chirkov^{a, c, *}

^aFaculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

^bEngelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^cKurchatov Genomic Centre of the Nikita Botanical Garden — National Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Yalta, 298648 Russia

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

Tomato aspermy virus (TAV, genus *Cucumovirus* from the family Bromoviridae) is one of the most common and harmful chrysanthemum viruses, causing severe flower distortion, size reduction and color breaking. Metatranscriptome sequencing of chrysanthemum plants of the Ribonette and Golden Standard cultivars from the collection of the Nikita Botanical Garden (Yalta, Republic of Crimea) generated TAV-related reads. The complete genomes of two Russian isolates of the virus were assembled from the reads obtained. This is the first report of full-length TAV genomes from Russia. Typically of cucumoviruses, the segmented TAV genome is represented by three single-stranded positive-sense linear RNA molecules with a length of 3412 (RNA1), 3097 (RNA2) and 2219 (RNA3) nucleotides. Five open reading frames (ORF) have been identified that encode replicase (ORF1), RNA-dependent RNA polymerase (ORF2a), silencing suppressor protein (ORF2b), movement protein (ORF3a) and the virus coat protein (ORF3b). The identity of the TAV genomes from the two chrysanthemum cultivars was 99.8% for all three viral RNAs, and with other TAV isolates from Genbank — 97.5–99.7 (RNA1), 93.8–99.8 (RNA2), and 89.3–99.3% (RNA3). Phylogenetic analysis showed that RNA1 and RNA3 of the Russian isolates were assigned to heterogeneous groups of TAV isolates found on various plant species in different regions of the world. At the same time, RNA2 clearly clustered with tomato isolates SKO20ST2 from Slovenia and PV-0220 from Bulgaria and, to a lesser extent, with the Iranian isolate Ker.Mah.P from petunia and the Chinese isolate Henan from chrysanthemum. The incongruence of phylogenetic trees reconstructed from different segments of the viral genome suggests pseudo-recombination (reassortment) in the Russian TAV isolates.

Keywords: plant viruses, tomato aspermy virus, chrysanthemum, high-throughput sequencing, reassortment