

Диагностика вирусов рода *Tobamovirus*, заражающих пасленовые овощные культуры

Е.Н. ЛОЗОВАЯ¹, Ю.Н. ПРИХОДЬКО²,
Т.С. ЖИВАЕВА³, Ю.А. ШНЕЙДЕР⁴, Е.В. КАРИМОВА⁵

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»
(ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. Раменское,
Московская обл., Россия

¹ e-mail: evgeniyaf@mail.ru

² e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru

³ e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru

⁴ ORCID 0000-0002-7565-1241,

e-mail: yury.shneyder@mail.ru

⁵ ORCID 0000-0001-6474-8913,

e-mail: elenavkar@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Тобамовирусы мозаики томата (ToMV), табачной мозаики (TMV), коричневой морщинистости плодов томата (ToBRFV), слабой крапчатости перца (PMMoV), слабой зеленой мозаики табака (TMGMV) являются опасными патогенами пасленовых овощных культур в открытом и защищенном грунте. Потери урожая томата и перца в результате заражения этими патогенами могут достигать 100%. Раннее выявление зараженных партий семян и очагов этих вирусов имеет важнейшее значение для предотвращения их быстрого распространения. В ходе исследований выполнена оценка специфичности семи тест-систем для иммуноферментного анализа (ИФА) к TMV, ToMV, TMGMV и PMMoV ведущих фирм-производителей. Проведена отработка полимеразной цепной реакции (ПЦР) с 21 парой универсальных и видоспецифичных праймеров. Определены праймеры, позволяющие проводить универсальное выявление комплекса тобамовирусов на пасленовых овощных культурах. Проведена отработка двух методик мультиплексной ПЦР для выявления и идентификации нескольких вирусов одновременно. Осуществлен скрининг праймеров в отношении их специфичности к TMV, ToMV, TMGMV и PMMoV. Разработаны собственные праймеры, характеризующиеся высокой специфичностью к TMV и ToMV.

Ключевые слова. Тобамовирусы, выявление и идентификация, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция, тест-системы, праймеры.

ВВЕДЕНИЕ

Род *Tobamovirus* в настоящее время объединяет 39 вирусов (Adams et al., 2012). В соответствии с генетической структурой, кругом растений-хозяев и филогенетическим родством, эти вирусы подразделяются на 8 подгрупп, заражающих

Diagnosis of *Tobamovirus* genus viruses infecting Solanaceae

E.N. LOZOVAYA¹, YU.N. PRIKHODKO²,
T.S. ZHIVAEVA³, YU.A. SHNEYDER⁴, E.V. KARIMOVA⁵

FGBU "All-Russian Plant Quarantine Center"
(FGBU "VNIKIR"), Bykovo, Ramenskoye, Moscow
Oblast, Russia

¹ e-mail: evgeniyaf@mail.ru

² e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru

³ e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru

⁴ ORCID 0000-0002-7565-1241,

e-mail: yury.shneyder@mail.ru

⁵ ORCID 0000-0001-6474-8913,

e-mail: elenavkar@mail.ru

ABSTRACT

Tomato mosaic virus (ToMV), Tobacco mosaic virus (TMV), Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV), Pepper mild mottle virus (PMMoV), Tobacco mild green mosaic virus (TMGMV) are serious pests of Solanaceae in open and protected ground. Yield losses of tomato and pepper as a result of infection with these pathogens can reach 100%. Early detection of infected seed lots and outbreaks of these viruses is essential to prevent their rapid spread. In the course of the research, the specificity of seven test systems for enzyme immunoassay (ELISA) to TMV, ToMV, TMGMV and PMMoV of leading manufacturers was evaluated. The polymerase chain reaction (PCR) was tested with 21 pairs of universal and species-specific primers. Primers have been identified that allow universal detection of the tobamovirus complex on Solanaceae crops. Two methods of multiplex PCR were tested to detect and identify several viruses simultaneously. The primers were screened for their specificity for TMV, ToMV, TMGMV and PMMoV. Proprietary primers with high specificity for TMV and ToMV were developed.

Key words. Tobamoviruses, detection and identification, enzyme immunoassay, polymerase chain reaction, test systems, primers.

INTRODUCTION

At present, *Tobamovirus* genus involves 39 viruses (Adams et al., 2012). According to the genetic structure, range of host plants and phylogenetic relationship, these viruses are divided into 8 subgroups that infect plants of the families Solanaceae, Brassicaceae, Cactaceae, Apocynaceae, Cucurbitaceae, Malvaceae, Leguminosae and Passifloraceae, respectively (Li et al., 2017).

растения семейств Solanaceae, Brassicaceae, Cactaceae, Аросунасеае, Cucurbitaceae, Malvaceae, Leguminosae и Passifloraceae соответственно (Li et al., 2017).

Согласно литературным данным, растения перца заражают Bell pepper mottle virus (BPeMV), Obuda pepper virus (ObPV), Paprika mild mottle virus (PaMMV), Pepper mild mottle virus (PMMoV), Ribgrass mosaic virus (RMV), Tobacco mild green mosaic virus (TMGMV), Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV), Tobacco mosaic virus (TMV) и Tomato mosaic virus (ToMV) (Smith, Dombrovsky, 2019; Hančinský et al., 2020).

Растения томата заражают TMGMV, ToBRFV, TMV, ToMV и Tomato mottle mosaic virus (ToMMV), из которых наиболее важное экономическое значение имеют TMV, ToMV, ToBRFV и ToMMV.

Растения баклажана заражают TMGMV, TMV, ToMV и ToMMV (Smith, Dombrovsky, 2019; Hančinský et al., 2020).

ToBRFV является карантинным объектом для стран Евразийского экономического союза и Европейской и Средиземноморской организации по карантину и защите растений (ЕОКЗР), а ToMMV включен в Сигнальный перечень ЕОКЗР.

Все тобамовирусы имеют сходные биологические свойства. Эффективно распространяются с инфицированными семенами, водой, почвенными субстратами, питательными растворами и т. п. Благодаря уникальной структуре вирионов тобамовирусы в течение многих лет сохраняют инфекционность вне растений-хозяев, в том числе на картоне, стекле, пластике, металлах, поддонах для овощей, упаковочном материале, инструментах, транспортных средствах, сельскохозяйственном оборудовании, одежде рабочих и т. д. (Broadbent, Fletcher, 1963; Reingold et al., 2016; Smith, Dombrovsky, 2019). TMV сохраняет жизнеспособность в табачном дыме (Lucas, 1975). ToMV выявляли в ледниках Гренландии (Castello et al., 1999), облаках и тумане (Castello et al., 1995), морской воде (Kegler et al., 1994) и т. п.

Заражение тобамовирусами происходит контактным способом, когда возникают малейшие механические повреждения корней и кутикулы листьев, неизбежно появляющиеся под влиянием различных биотических и абиотических факторов, но особенно часто в ходе проведения сельскохозяйственных работ.

Тобамовирусы мозаики томата (ToMV) и табачной мозаики (TMV) широко распространены в Российской Федерации (Чанг, 2013). В связи с ежегодным значительным объемом импорта семян и плодов баклажана, томата и перца из зарубежных стран высока вероятность проникновения в РФ и других тобамовирусов, заражающих пасленовые культуры.

Диагностика тобамовирусов до вида сопряжена со значительными сложностями, обусловленными высокой аналогией их биологических, серологических и генетических свойств. ToMV, TMGMV, PMMoV и несколько других тобамовирусов первоначально были описаны лишь в качестве штаммов TMV и были выделены в валидные виды только после детального изучения их геномов.

Характерной особенностью эпидемиологии тобамовирусов является возможность наличия

According to the literature, pepper plants are infected by Bell pepper mottle virus (BPeMV), Obuda pepper virus (ObPV), Paprika mild mottle virus (PaMMV), Pepper mild mottle virus (PMMoV), Ribgrass mosaic virus (RMV), Tobacco mild green mosaic virus (TMGMV), Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV), Tobacco mosaic virus (TMV) and Tomato mosaic virus (ToMV) (Smith, Dombrovsky, 2019; Hančinský et al., 2020).

Tomatoes are infected with TMGMV, ToBRFV, TMV, ToMV and Tomato mottle mosaic virus (ToMMV), of which the most important economic value have TMV, ToMV, ToBRFV and ToMMV.

Eggplants are infected with TMGMV, TMV, ToMV and ToMMV (Smith, Dombrovsky, 2019; Hančinský et al., 2020).

ToBRFV is a quarantine object for the countries of the Eurasian Economic Union and the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO), and ToMMV is included in the EPPO Alert List.

All tobamoviruses have similar biological properties. They efficiently spread with infected seeds, water, soil substrates, nutrient solutions, etc. Due to the unique structure of the virions, tobamoviruses remain infective outside of host plants for many years, including on cardboard, glass, plastic, metals, vegetable trays, packaging material, tools, vehicles, agricultural equipment, workers' clothing, etc. (Broadbent, Fletcher, 1963; Reingold et al., 2016; Smith, Dombrovsky, 2019). TMV remains viable in tobacco smoke (Lucas, 1975). ToMV were detected in the glaciers of Greenland (Castello et al., 1999), clouds and fog (Castello et al., 1995), sea water (Kegler et al., 1994), etc.

Infection with tobamoviruses occurs by contact, when the slightest mechanical damage to the roots and cuticle of the leaves occurs, which inevitably appears under the influence of various biotic and abiotic factors, but especially often during agricultural work.

Tobamo mosaic viruses (ToMV) and tobacco mosaic viruses (TMV) are widespread in the Russian Federation (Chang, 2013). Due to the significant annual import of seeds and fruits of eggplant, tomato and pepper from other countries, there is a high probability of introduction into the Russian Federation of other tobamoviruses infecting Solanaceae.

Diagnosis of tobamoviruses to species level is associated with significant difficulties due to the high similarity of their biological, serological, and genetic properties. ToMV, TMGMV, PMMoV and several other tobamoviruses were originally described only as strains of TMV and were isolated into valid species only after a detailed study of their genomes.

A characteristic feature of the epidemiology of tobamoviruses is the possibility of both their mixed infection and the ability to infect plants together with viruses of other taxonomic groups. Therefore, the generally accepted approach in the diagnosis of viruses in vegetable crops is the use of universal primers at the first stage, which allows the detection of all viruses of the genus, followed by the use of species-specific primers at the second stage for their identification. In addition, an important element in the diagnosis of tobamoviruses is the differentiation of closely related TMV,

как их смешанной инфекции, так и способности заражать растения совместно с вирусами других таксономических групп. Поэтому общепринятым подходом в диагностике вирусов на овощных культурах является использование на первом этапе универсальных праймеров, позволяющих осуществлять выявление всех вирусов рода с последующим применением на втором этапе видоспецифичных праймеров для их идентификации. Кроме того, важным элементом диагностики тобамовирусов является дифференциация близкородственных TMV, ToMV, TMGMV и ToBRFV, в связи с этим все более широко применяется мультиплексная ПЦР, позволяющая в одном тесте осуществлять выявление двух и более объектов. Для корректной идентификации тобамовирусов до вида необходима детальная оценка специфичности используемых диагностических антисывороток и праймеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на базе научного подразделения ФГБУ «ВНИИКР» в 2020–2021 гг. Основными объектами исследований являлись вирусы рода *Tobamovirus*, заражающие овощные культуры: мозаики томата (ToMV), табачной мозаики (TMV), коричневой морщинистости плодов томата (ToBRFV), слабой (или мягкой) крапчатости перца (PMMoV), слабой крапчатости паприки (PaMMV), крапчатости белого перца (BPeMV), слабой зеленой мозаики табака (TMGMV), зеленой крапчатой мозаики огурца (CGMMV) и зеленой крапчатой мозаики цукини (ZGMMV). Эксперименты проводили со следующими референтными изолятами тобамовирусов из коллекции DSMZ (Германия): TMV PV-0107, PV-0055, PV-1199 и PV-1195, ToMV PV-1180, PV-0141, PV-0143 и PV-0846, CGMMV PC-0375, TMGMV PV-0124, PV-0110 и PV-1112, PMMoV PV-0093 и PV-0166, ToBRFV PV-1244, PaMMV PV-0606 и BPeMV PC-0170, а также с положительными контролями для ИФА к TMV, ToMV, TMGMV, PMMoV и ZGMMV фирм Adgen (Великобритания) и Loewe (Германия).

Для серологического метода диагностики была проведена оценка специфичности диагностических наборов для ИФА к TMV, ToMV, TMGMV, PMMoV, ToBRFV и CGMMV ведущих фирм-производителей. Оценку специфичности проводили со всеми имеющимися изолятами тобамовирусов. Тесты проводили согласно прилагаемым к наборам инструкциям фирм-производителей.

Для выделения нуклеиновых кислот использовали набор «Проба-НК» (ООО «АгроДиагностика», Россия).

Для проведения реакции обратной транскрипции для синтеза первой цепи кДНК исследуемых вирусов использовали следующие комплекты реагентов, согласно прилагаемым инструкциям:

- 1) «MMLV RT Kit» (ЗАО «Евроген», Россия);
- 2) «Комплект реагентов для обратной транскрипции» («АгроДиагностика», Россия).

Для проведения ПЦР использовали следующие наборы реагентов: «Multiplex PCR Kit» (Qiagen, США); «Screen Mix-HS» («Евроген», Россия); «5x Mas^{DD} TaqMix-2025» (ЗАО «Диалат Лтд.», Россия) и праймеры, указанные в таблице 1.

Термоциклические режимы использовали в соответствии с инструкциями фирм – производителей наборов.

ToMV, TMGMV, and ToBRFV; therefore, multiplex PCR is increasingly being used, which makes it possible to detect two or more objects in one test. For the correct identification of tobamoviruses to the species level, a detailed assessment of the specificity of the diagnostic antisera and primers used is required.

MATERIALS AND METHODS

The studies were carried out on the basis of the research department of VNIICR in 2020–2021. The main objects of research were viruses of the genus *Tobamovirus* infecting vegetable crops: Tomato mosaic virus (ToMV), Tobacco mosaic virus (TMV), Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV), Pepper mild mottle virus (PMMoV), Paprika mild mottle virus (PaMMV), Bell pepper mottle virus (BPeMV), Tobacco mild green mosaic virus (TMGMV), Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV), and Zucchini green mottle mosaic virus (ZGMMV). The experiments were carried out with the following reference tobamovirus isolates from the DSMZ collection (Germany): TMV PV-0107, PV-0055, PV-1199 and PV-1195, ToMV PV-1180, PV-0141, PV-0143 and PV-0846, CGMMV PC-0375, TMGMV PV-0124, PV-0110 and PV-1112, PMMoV PV-0093 and PV-0166, ToBRFV PV-1244, PaMMV PV-0606 and BPeMV PC-0170, as well as with positive controls for ELISA to TMV, ToMV, TMGMV, PMMoV and ZGMMV by Adgen (Great Britain) and Loewe (Germany).

For the serological diagnostic method, the specificity of diagnostic kits for ELISA for TMV, ToMV, TMGMV, PMMoV, ToBRFV and CGMMV of leading manufacturers was evaluated. Specificity assessment was performed with all available tobamovirus isolates. The tests were carried out according to the manufacturer's instructions supplied with the kits.

For the isolation of nucleic acids, the Proba-NK kit (AgroDiagnostica, Russia) was used.

To carry out the reverse transcription reaction for the synthesis of the first strand cDNA of the studied viruses, the following reagent kits were used, according to the attached instructions:

- 1) MMLV RT Kit (Evrogen, Russia);
- 2) Reagent kit for reverse transcription (AgroDiagnostica, Russia).

For PCR, the following reagent kits were used: Multiplex PCR Kit (Qiagen, USA); Screen Mix-HS (Evrogen, Russia); 5x Mas^{DD} TaqMix-2025 (Dialat Ltd., Russia) and primers listed in Table 1.

Thermal cycling modes were used in accordance with the instructions of the manufacturers of the kits.

The primers ToMV-2PF/ToMV-1PR developed by the authors are complementary to the ToMV coat protein gene region and amplify the 433 bp product. The analysis carried out using the Primer-BLAST program showed that these primers are complementary to the genome regions of 90 ToMV isolates deposited in the GenBank NCBI database, which makes it possible to identify a larger number of isolates of Russian origin.

To carry out the amplification reaction, a C1000 Touch thermal cycler (Bio-Rad, USA) was used.

PCR results were detected by electrophoresis in 1.5% agarose gel. The magnitude of the amplification

Таблица 1

Характеристика праймеров, испытанных для проведения ПЦР на наличие вирусов овощных культур

Table 1

Characteristics of the primers tested for PCR for the presence of vegetable viruses

Название праймера Primer	Последовательность 5'→3' Sequence 5'→3'	Длина продукта (п. н.) Product length (bp)	Автор Author
TobamoF	GCWAAGGTKGTWYTBGTRGAYGG	880	Li et.al., 2014
TobamoR	GTAATTGCTATTGDGTWCCWGC		
TobRT up1	GAR TAY SCI GCI YTI CAR AC	568	Dovas et al., 2004
TobRT do2	BGC YTC RAA RTT CCA		
Tob-Uni2 F	GTGTTGATGAGTTCRTGGA	804	Alishiri et al., 2013
Tob-Uni1 R	ATTTAAGTGGASGGAAAACACT		
TOBAMO-S1	GGGAATCAGTTTCAAACRCA	560	Menzel et al., 2019
TOBAMO-AS1	GGGGGGATTCTGAACCYCT		
Tobamo-CP(F)	GWCGCSGATCBGATTCGT WTAAATATG	750	Sharma et al., 2014
Tobamo-CP(R)	TGGGCCSCTACCSGSGG		
Tob F-5476	GAAGAAGTTGTTGATGAGTTCAT	808	Levitzky et al., 2019
Tob R-6287	GATTTAAGTGGAGGGAAAAACAC		
ToMV-F	CATCTGTATGGGCTGAC	421	Chen et al., 2011
ToMV-R	GAGGTCCARACCAAMCCAG		
ToMV-F1	CTC CAT CGT TCACAC TCG TTA CT	508	Gumus, Paylan, 2013
ToMV-R1	GATCTGTCAAAG TCT GAGAAA CTT C		
ToMV-F3	CGAGAGGGGCAACAAACAT	318	Kumar et al., 2011
ToMV-R3	ACCTGTCTCCATCTCTTTGG		
ToMV FM	GTTTCATTGTGCTGTTGAGTAC	362	Yan et al., 2021
ToMV RM	AGAAGTACCCATATTGCTTCTTG		
ToMV-2PF	TCTGTATGGGCTGACCCTGT	433	В рамках данной работы As part of this work
ToMV-1PR	AAGATGCAGGTGCAGAGGTC		
TMV-F3	CGACATCAGCCGATGCAGC	880	Kumar et al., 2011
TMV-R3	ACCGTTTTTCGAACCGAGACT		
TMV-F2	ATTAGACCGCTAGTCACAGCAC	84	Yang et al., 2012
TMV-R2	GTGGGGTTTCGCCTGATTTT		
TMV-MP-F	ATGGCTCTAGTTGTTAAAGG	807	Zhu et al., 2020
TMV-MP-R	TAAAAACGAATCCGATTTCGG		
TMV 8PF-1	GTTCTTGTCATCAGCGTGG	448	В рамках данной работы As part of this work
TMV 3PR	ACCTCAAGTTCAGGACCAG		
TMV FM	TGTGCAACACTCCGCRAAT	999	Yan et al., 2021
TMV RM	CGGTTCGAGATCGAAAC		
ToBRFV FM	CTTCCAAACGTGTACGCAC	604	Yan et al., 2021
ToBRFV RM	GTCGAGAGATATGTCGAATAGA		
TMV-spec	CGGTCAAGTCCGAACAAGAA	690	Letschert et al., 2002
ToMV-spec	CGGAAGGCCTAAACCAAAAAG	694	
TMGMV-spec	AARTAAATAAYAGTGGTAAGAAGGG	720	
Tob-Uni1 R	ATTTAAGTGGASGGAAAACACT	525	Kim et al., 2006
TMGMV CPTMF-F	TCGAGTACGTTTAAATCAAT		
TMGMV CPTMG-R	ATTTTAGGAAATCTCACAAC	65	Haramoto et al., 2013
PMMV-FP1- rev	GAGTGGTTTGACCTTAACGTTTG		
PMMV-RP1	TTG TCG GTT GCA ATG CAA GT		

Таблица 2

Определение специфичности тест-систем для ИФА к TMV, ToMV, TMGMV, PMMoV разных фирм-производителей

Table 2

Determination of the specificity of test systems for ELISA to TMV, ToMV, TMGMV, PMMoV from different manufacturers

Тобамовирусы Tobamoviruses	Тест-системы для ИФА Test systems for ELISA						
	TMV		ToMV			TMGMV	PMMoV
	Loewe	DSMZ	DSMZ	Adgen	Agdia	Loewe	Loewe
TMV	+	+	+/-	+	+/-	+/-	-
ToMV	-	+/-	+	+	+	+/-	-
TMGMV	-	-	+/-	+	+/-	+	+/-
ToBRFV	-	-	-	+	+	-	-
PMMoV	-	-	-	+	+/-	+	+
PaMMV	-	-	-	-	-	-	-
BPemV	-	+/-	-	+	+	+	+/-
CGMMV	-	-	-	+/-	-	-	+/-
ZGMMV	-	-	-	-	-	-	+/-

«+» – достоверный сероположительный сигнал;

«+/-» – слабый недостоверный положительный сигнал;

«-» – отсутствие сероположительного сигнала.

“+” – reliable seropositive signal; “+/-” – weak unreliable positive signal;

“-” – no seropositive signal.

Разработанные авторами праймеры ToMV-2PF/ToMV-1PR комплементарны участку гена белка оболочки ToMV и амплифицируют продукт величиной 433 п. н. Анализ, проведенный с помощью программы Primer-BLAST, показал, что эти праймеры комплементарны участкам генома 90 изолятов ToMV, депонированных в базу данных GenBank NCBI, что позволяет выявлять большее количество изолятов российского происхождения.

Для проведения реакции амплификации использовали термоциклер C1000 Touch (Bio-Rad, США).

Детекцию результатов ПЦР осуществляли с помощью электрофореза в 1,5%-м агарозном геле. Величину продуктов амплификации измеряли, используя маркеры молекулярного веса ДНК GeneRuler™ 100+ п. н. и Fast Ruler™ (оба – Thermo Fisher Scientific, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В процессе изучения серологического метода диагностики была установлена высокая специфичность тест-системы для ИФА к TMV фирмы Loewe (Германия). Эта тест-система реагировала со всеми испытуемыми изолятами целевого объекта (TMV) с высокими значениями экстинкции. Перекрестной реакции этой тест-системы со всеми изолятами близкородственных тобамовирусов не наблюдалось (табл. 2).

По результатам проведенных испытаний было установлено, что большинство тест-систем для ИФА к тобамовирусам неспецифичны, ввиду чего их целесообразно использовать лишь для

products was measured using GeneRuler™ 100+ bp DNA molecular weight markers. and Fast Ruler™ (both from Thermo Fisher Scientific, USA).

RESULTS OF THE RESEARCH

While studying the serological diagnostic method, a high specificity of the test system for ELISA for TMV from Loewe (Germany) was established. This test system reacted with all test isolates of the target object (TMV) with high extinction values. No cross-reaction of this test system with all isolates of closely related tobamoviruses was observed (Table 2).

According to the results of the tests, it was found that most of the test systems for ELISA for tobamoviruses are non-specific, which is why it is advisable to use them only for preliminary tests for the presence of these pathogens, followed by analysis of seropositive samples by PCR with species-specific primers. An exception is the TMV ELISA test system from Loewe (Germany), which can be used both for screening tests and for TMV identification.

To work out the diagnosis of tobamoviruses to the genus level, the universal primers Tobamo-CP(F)/

Tobamo-CP(R) (Sharma et al., 2014), Tob-Uni2 F/Tob-Uni1 R (Alishiri et al., 2013), TobamoF/TobamoR (Li et al., 2014), TobRT up1/TobRT do2 (Dovas et al., 2004), TOBAMO-S1/TOBAMO-AS1 (Menzel et al., 2019), Tob F-5476/Tob R-6287 (Levitzky et al., 2019) and primers included in the “Tobamovirus Group PCR Primer Mix” diagnostic kit (Agdia, USA) were tested.

Based on the results of the experiments, it was found that to detect the complex of tobamoviruses on Solanaceae crops, it is advisable to use the universal primers TobRT up1/TobRT do2 (Dovas et al., 2004), which are characterized by the widest spectrum of action.

Universal primers Tob-Uni2 F/Tob-Uni1 R (Alishiri et al., 2013), TobamoF/TobamoR (Li et al., 2014), and TOBAMO-S1/TOBAMO-AS1 (Menzel et al., 2019), as well as diagnostic kit “Tobamovirus Group PCR Primer Mix” allow to effectively diagnose TMV, ToMV and TMGMV. Primers Tob F-5476/Tob R-6287 (Levitzky et al., 2019) require additional experiments.

For the primers TobRT up1/TobRT do2 (Dovas et al., 2004), the optimal test procedure was determined with RNA isolation using the Proba-NK kit (AgroDiagnostica), cDNA synthesis with the MMLV RT Kit (Evrogen) and PCR with the 5x MasDD TaqMix-2025 kit (Dialat Ltd.) (Fig. 1).

Studies were performed using duplex PCR for the simultaneous detection of TMV and ToMV using a combination of primers TMV-F3/TMV-R3 and ToMV-F3/

предварительных тестов на наличие этих патогенов с последующим анализом сероположительных образцов методом ПЦР с видоспецифичными праймерами. Исключением является тест-система для ИФА к TMV фирмы Loewe (Германия), которая может быть использована как для проведения скрининговых тестов, так и для идентификации TMV.

Для того чтобы отработать диагностику тобамовирусов до рода, было проведено испытание универсальных праймеров Tobamo-CP(F)/Tobamo-CP(R) (Sharma et al., 2014), Tob-Uni2 F/Tob-Uni1 R (Alishiri et al., 2013), TobamoF/TobamoR (Li et al., 2014), TobRT up1/TobRT do2 (Dovas et al., 2004), TOBAMO-S1/TOBAMO-AS1 (Menzel et al., 2019), Tob F-5476/Tob R-6287 (Levitzky et al., 2019) и праймеров, входящих в диагностический набор «Tobamovirus Group PCR Primer Mix» (Agdia, США).

По результатам проведенных экспериментов установлено, что для выявления комплекса тобамовирусов на пасленовых овощных культурах целесообразно использовать универсальные праймеры TobRT up1/TobRT do2 (Dovas et al., 2004), характеризующиеся наиболее широким спектром действия.

Универсальные праймеры Tob-Uni2 F/Tob-Uni1 R (Alishiri et al., 2013), TobamoF/TobamoR (Li et al., 2014) и TOBAMO-S1/TOBAMO-AS1 (Menzel et al., 2019), а также диагностический набор «Tobamovirus Group PCR Primer Mix» позволяют эффективно диагностировать TMV, ToMV и TMGMV. Для праймеров Tob F-5476/Tob R-6287 (Levitzky et al., 2019) необходимо проведение дополнительных экспериментов.

Для праймеров TobRT up1/TobRT do2 (Dovas et al., 2004) определена оптимальная методика проведения тестов с выделением РНК набором «Проба-НК» («АгроДиагностика»), синтезом кДНК набором «MMLV RT Kit» («Евроген») и проведения ПЦР с набором «5x MasDD TaqMix-2025» («Диалат Лтд.») (рис. 1).

Проведены исследования с применением дуплексной ПЦР для одновременного выявления TMV и ToMV с использованием комбинации праймеров TMV-F3/TMV-R3 и ToMV-F3/ToMV-R3 (Kumar et al., 2011) (рис. 2). После испытания нескольких наборов реагентов для ПЦР выявлен оптимальный вариант с использованием набора реагентов «Multiplex PCR Kit» (Qiagen) для проведения ПЦР. Данный тест был успешно апробирован для выявления TMV и ToMV на томате в нескольких овощеводческих хозяйствах РФ.

Проведены испытания мультиплексного теста для одновременного выявления TMV, ToMV и ToBRFV. Установлена высокая видоспецифичность используемых в этом тесте праймеров TMV FM/TMV RM, ToMV FM/ToMV RM и ToBRFV FM/ToBRFV RM (Yan et al., 2021), которые реагировали лишь с изолятами целевых объектов. Определен оптимальный вариант проведения этого теста с использованием набора «Multiplex PCR Kit» (Qiagen) для проведения ПЦР и набора для обратной транскрипции фирмы «АгроДиагностика».

В формате классической ОТ-ПЦР¹ было проведено испытание трех пар праймеров, разработанных для выявления тобамовируса мозаики томата: ToMV-F3/ToMV-R3 (Kumar et al., 2011), ToMV-спец/

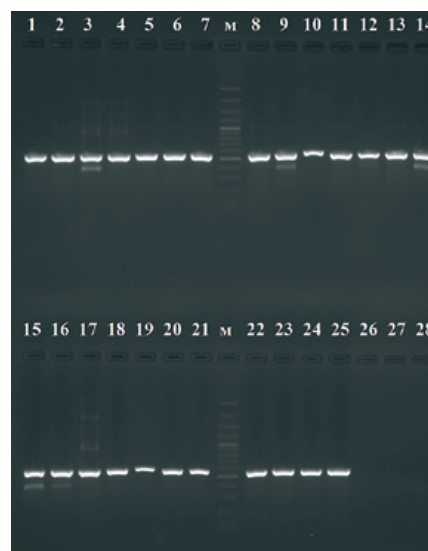


Рис. 1. Реакция праймеров ToBRT up1/ToBRT do2 (Dovas et al., 2004) с изолятами различных тобамовирусов. Образцы: 1 – TMV PV-0107; 2 – TMV PV-0055; 3 – TMV PV-1199; 4 – TMV PV-1195; 5 – ToMV PC-0135; 6 – ToMV PV-1180; 7 – ToMV PV-0141; 8 – ToMV PV-0143; 9 – ToMV PV-0846; 10 – CGMMV PC-0375; 11 – TMGMV PV-0124; 12 – TMGMV PV-0110; 13 – TMGMV PV-1112; 14 – PMMoV PV-0093; 15 – PMMoV PV-0166; 16 – PaMMV PV-0606; 17 – BPeMV PC-0170 (все – DSMZ); 18 – ZGMMV PC07167 (Loewe); 19 – CGMMV 07022 PC (Loewe); 20 – PMMoV 07096 PC (Loewe); 21 – TMGMV 07176 PC (Loewe); 22 – TMV 1065-11 (Adgen); 23 – ToMV 1070-11 (Adgen); 24 – TMV (МГУ); 25 – ToBRFV PV-1244 (DSMZ); 26–28 – К (вода); М – маркеры молекулярной массы.

Fig. 1. Reaction of primers ToBRT up1/ToBRT do2 (Dovas et al., 2004) with isolates of various tobamoviruses. Samples: 1 – TMV PV-0107; 2 – TMV PV-0055; 3 – TMV PV-1199; 4 – TMV PV-1195; 5 – ToMV PC-0135; 6 – ToMV PV-1180; 7 – ToMV PV-0141; 8 – ToMV PV-0143; 9 – ToMV PV-0846; 10 – CGMMV PC-0375; 11 – TMGMV PV-0124; 12 – TMGMV PV-0110; 13 – TMGMV PV-1112; 14 – PMMoV PV-0093; 15 – PMMoV PV-0166; 16 – PaMMV PV-0606; 17 – BPeMV PC-0170 (all – DSMZ); 18 – ZGMMV PC07167 (Loewe); 19 – CGMMV 07022 PC (Loewe); 20 – PMMoV 07096 PC (Loewe); 21 – TMGMV 07176 PC (Loewe); 22 – TMV 1065-11 (Adgen); 23 – ToMV 1070-11 (Adgen); 24 – TMV (MSU); 25 – ToBRFV PV-1244 (DSMZ); 26–28 – K (water); M – molecular weight markers.

ToMV-R3 (Kumar et al., 2011) (Fig. 2). After testing several PCR reagent kits, the best option was identified using the Multiplex PCR Kit (Qiagen) for PCR. This test has been successfully tested to detect TMV and ToMV on tomato in several vegetable farms in the Russian Federation.

A multiplex test was tested for the simultaneous detection of TMV, ToMV and ToBRFV. The primers TMV FM/TMV RM, ToMV FM/ToMV RM, and ToBRFV FM/ToBRFV RM (Yan et al., 2021) used in this test were

¹ ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.

Tob-Uni1 R (Letschert et al., 2002) и ToMV-2PF/ToMV-1PR (НМОВБ ВНИИКР²).

По результатам проведенных экспериментов установлена недостаточно высокая видоспецифичность праймеров ToMV-F3/ToMV-R3 (Kumar et al., 2011), что ограничивает возможность их использования для проведения подтверждающих тестов на наличие ToMV.

Для праймеров ToMV-spec/Tob-Uni1 R (Letschert et al., 2002) и разработанных нами праймеров ToMV-2PF/ToMV-1PR установлена высокая специфичность к ToMV (рис. 3), что позволяет рекомендовать эти праймеры для проведения подтверждающих тестов на наличие ToMV.

Для разработки подтверждающего теста на наличие тобамовируса мозаики табака (TMV) проведено испытание шести пар праймеров, комплементарных различным участкам генома этого вируса: TMV-F2/TMV-R2 (Yang et al., 2012), TMV-spec/Tob-Uni1 R (Letschert et al., 2002), TMV-F3/TMV-R3 (Kumar et al., 2011), TMV 8PF-1/TMV 3PR (НМОВБ ВНИИКР), TMV-MP-F/TMV-MP-R (Zhu et al., 2020) и TMV FM/TMV RM (Yan et al., 2021) (рис. 3). Установлено, что наиболее высокой специфичностью к целевому объекту (TMV) характеризуются праймеры TMV-F2/TMV-R2 (Yang et al., 2012), TMV 8PF-1/TMV 3PR (НМОВБ ВНИИКР) (рис. 3), TMV-MP-F/TMV-MP-R (Zhu et al., 2020) и TMV FM/TMV RM (Yan et al., 2021), которые не реагировали со всеми изолятами нецелевых тобамовирусов.

Для диагностики TMGMV проведено испытание праймеров TMGMV CPTMF-F/TMGMV CPTMG-R (Kim et al., 2006) и TMGMV-spec/Tob-Uni1 R (Letschert et al., 2002). Установлена возможность эффективного использования праймеров TMGMV CPTMF-F/TMGMV CPTMG-R (Kim et al., 2006) для высокоспецифичного выявления TMGMV.

Констатирована высокая специфичность к PMMoV праймеров PMMV-FP1-rev/ PMMV-RP1 (Nagamoto et al., 2013). Установлена возможность эффективного использования этих праймеров в форматах 2-этапной классической ОТ-ПЦР и 2-этапной Eva Green ОТ-ПЦР-PB³.

ВЫВОДЫ

По результатам проведенных испытаний семи тест-систем для ИФА к TMV, ToMV, ToBRFV, TMGMV и PMMoV нескольких фирм-производителей установлена недостаточно высокая специфичность большинства из них к целевым объектам. Исключением является тест-система для ИФА к TMV фирмы Loewe (Германия), которая может быть использована как для проведения скрининговых тестов, так и для идентификации TMV. Остальные тест-системы целесообразно использовать лишь для предварительных скрининговых тестов на наличие тобамовирусов с последующим анализом сероположительных образцов методом ПЦР с видоспецифичными праймерами.

Установлено, что для выявления комплекса тобамовирусов на овощных культурах целесообразно использовать универсальные праймеры TobRT up1/TobRT do2 (Dovas et al., 2004), характеризующиеся

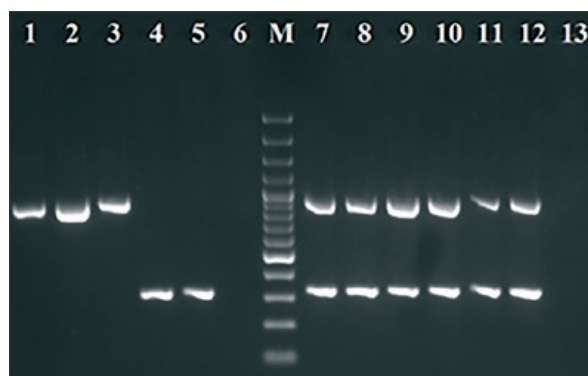


Рис. 2. Электрофореграмма. Выявление ToMV и TMV методом 2-этапной мультиплексной ОТ-ПЦР с использованием комбинации праймеров TMV-F3/TMV-R3 и ToMV-F3/ToMV-R3 (Kumar et al., 2011). Образцы: 1 – TMV PV-0107; 2 – TMV PV-0055; 3 – TMV PV-1199; 4 – ToMV PC-0135; 5 – ToMV PV-1180; 6 – TMGMV PV-0124; 7 – TMV PV-0107 + ToMV PC-0135; 8 – TMV PV-0107 + ToMV PV-1180; 9 – TMV PV-0055 + ToMV PC-0135; 10 – TMV PV-0055 + ToMV PV-1180; 11 – TMV PV-1199 + ToMV PC-0135; 12 – TMV PV-1199 + ToMV PV-1180; 13 – К (вода); М – маркеры молекулярного массы.

Fig. 2. Electropherogram. Detection of ToMV and TMV by 2-step multiplex RT-PCR using a combination of primers TMV-F3/TMV-R3 and ToMV-F3/ToMV-R3 (Kumar et al., 2011). Samples: 1 – TMV PV-0107; 2 – TMV PV-0055; 3 – TMV PV-1199; 4 – ToMV PC-0135; 5 – ToMV PV-1180; 6 – TMGMV PV-0124; 7 – TMV PV-0107 + ToMV PC-0135; 8 – TMV PV-0107 + ToMV PV-1180; 9 – TMV PV-0055 + ToMV PC-0135; 10 – TMV PV-0055 + ToMV PV-1180; 11 – TMV PV-1199 + ToMV PC-0135; 12 – TMV PV-1199 + ToMV PV-1180; 13 – K (water); M – molecular weight markers.

found to be highly species-specific and reacted only with isolates of the target objects. The optimal variant of this test was determined using the Multiplex PCR Kit (Qiagen) for PCR and the reverse transcription kit (AgroDiagnostica).

Three pairs of primers designed to detect tobamovirus were tested in the classical RT-PCR format: ToMV-F3/ToMV-R3 (Kumar et al., 2011), ToMV-spec/Tob-Uni1 R (Letschert et al., 2002) and ToMV-2PF/ToMV-1PR (VBRMD VNIIEK^{*}).

According to the results of the experiments, the insufficiently high species specificity of the primers ToMV-F3/ToMV-R3 (Kumar et al., 2011) was established, which limits the possibility of their use for confirmatory tests for the presence of ToMV.

The primers ToMV-spec/Tob-Uni1 R (Letschert et al., 2002) and the primers ToMV-2PF/ToMV-1PR developed by us showed a high specificity for ToMV (Fig. 3), which makes it possible to recommend these primers for carrying out confirmatory tests for availability of ToMV.

^{*} VBRMD VNIIEK – Virology and Bacteriology Research and Methodology Department, FGBU “VNIIEK”.

² НМОВБ ВНИИКР – научно-методический отдел вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР».

³ PB – в реальном времени.

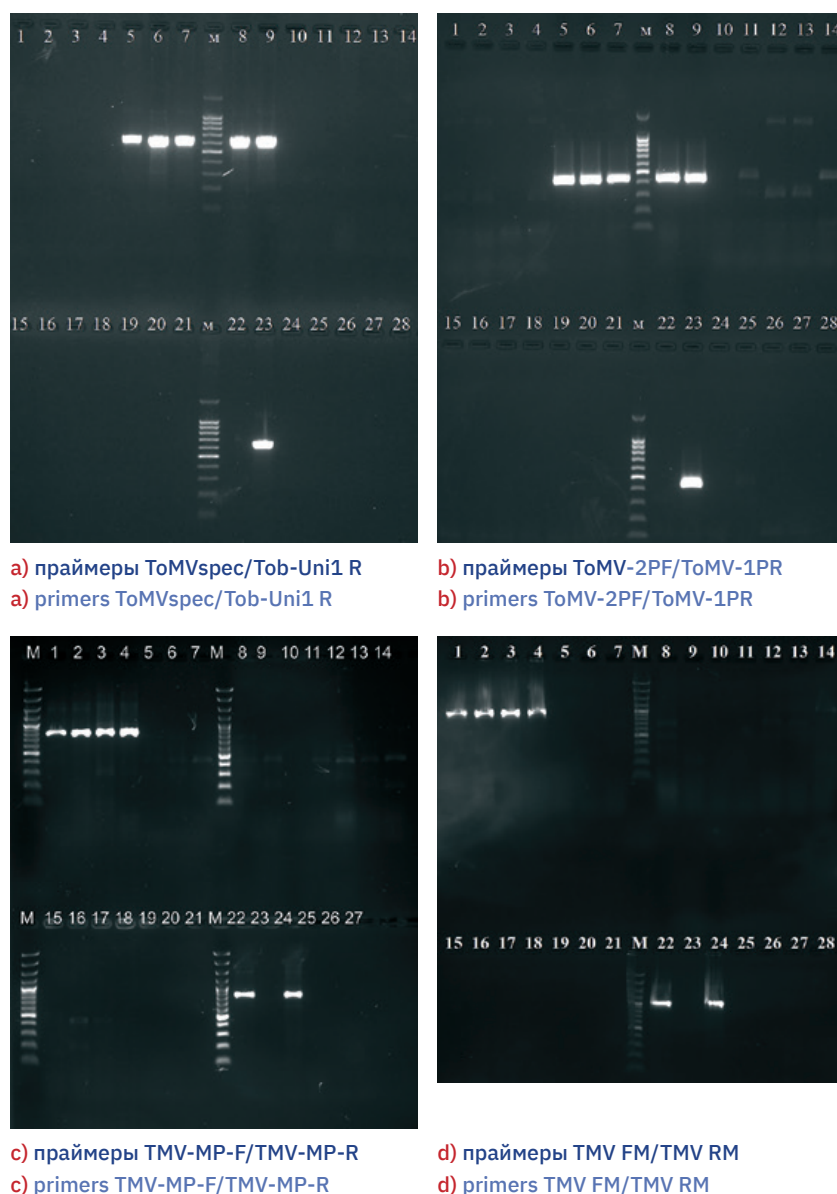


Рис. 3. Электрофореграмма. ПЦР с праймерами:
(a) ToMVspec/Tob-Uni1 R (Letschert et al., 2002),
(b) ToMV-2PF/ToMV-1PR (НМОВБ ВНИИКР),
(c) TMV-MP-F/TMV-MP-R (Zhu et al., 2020) и (d) TMV FM/TMV RM (Yan et al., 2021)
с изолятами различных тобамовирусов.
Образцы: 1 – TMV PV-0107; 2 – TMV PV-0055;
3 – TMV PV-1199; 4 – TMV PV-1195; 5 – ToMV PC-0135; 6 – ToMV PV-1180;
7 – ToMV PV-0141; 8 – ToMV PV-0143; 9 – ToMV PV-0846; 10 – CGMMV PC-0375;
11 – TMGMV PV-0124; 12 – TMGMV PV-0110; 13 – TMGMV PV-1112;
14 – PMMoV PV-0093; 15 – PMMoV PV-0166; 16 – PaMMV PV-0606;
17 – BPeMV PC-0170 (все – DSMZ); 18 – ZGMMV PC07167 (Loewe);
19 – CGMMV 07022 PC (Loewe); 20 – PMMoV 07096 PC (Loewe);
21 – TMGMV 07176 PC (Loewe); 22 – TMV 1065-11 (Adgen);
23 – ToMV 1070-11 (Adgen); 24 – TMV (МГУ); 25 – ToBRFV PV-1244 (DSMZ);
26–28 – К (вода); М – маркеры молекулярного веса.

Fig. 3. Electrophoregram. PCR with primers:
(a) ToMVspec/Tob-Uni1 R (Letschert et al., 2002),
(b) ToMV-2PF/ToMV-1PR (VBRMD VNIKR),
(c) TMV-MP-F/TMV-MP-R (Zhu et al., 2020)
and (d) TMV FM/TMV RM (Yan et al., 2021) with isolates of various tobamoviruses.
Samples: 1 – TMV PV-0107; 2 – TMV PV-0055; 3 – TMV PV-1199; 4 – TMV PV-1195;
5 – ToMV PC-0135; 6 – ToMV PV-1180; 7 – ToMV PV-0141; 8 – ToMV PV-0143;
9 – ToMV PV-0846; 10 – CGMMV PC-0375; 11 – TMGMV PV-0124;
12 – TMGMV PV-0110; 13 – TMGMV PV-1112; 14 – PMMoV PV-0093;
15 – PMMoV PV-0166; 16 – PaMMV PV-0606; 17 – BPeMV PC-0170 (all – DSMZ);
18 – ZGMMV PC07167 (Loewe); 19 – CGMMV 07022 PC (Loewe);
20 – PMMoV 07096 PC (Loewe); 21 – TMGMV 07176 PC (Loewe);
22 – TMV 1065-11 (Adgen); 23 – ToMV 1070-11 (Adgen); 24 – TMV (MSU);
25 – ToBRFV PV-1244 (DSMZ); 26–28 – K (water); M – molecular weight markers.

To develop a confirmatory test for the presence of tobacco mosaic virus (TMV), six pairs of primers complementary to different regions of the genome of this virus were tested: TMV-F2/TMV-R2 (Yang et al., 2012), TMV-spec/Tob-Uni1 R (Letschert et al., 2002), TMV-F3/TMV-R3 (Kumar et al., 2011), TMV 8PF-1/TMV 3PR (VBRMD VNIKR), TMV-MP-F/TMV-MP-R (Zhu et al., 2020) and TMV FM/TMV RM (Yan et al., 2021) (Fig. 3). It has been established that primers are characterized by the highest specificity to the target object (TMV) are TMV-F2/TMV-R2 (Yang et al., 2012), TMV 8PF-1/TMV 3PR (VBRMD VNIKR) (Fig. 3), TMV-MP-F/TMV-MP-R (Zhu et al., 2020) and TMV FM/TMV RM (Yan et al., 2021), that did not react with all non-target tobamovirus isolates.

To diagnose TMGMV, the primers TMGMV CPTMF-F/TMGMV CPTMG-R (Kim et al., 2006) and TMGMV-spec/Tob-Uni1 R (Letschert et al., 2002) were tested. The possibility of effective use of primers TMGMV CPTMF-F/TMGMV CPTMG-R (Kim et al., 2006) for highly specific detection of TMGMV has been established.

The primers PMMoV-FP1-rev/ PMMoV-RP1 were found to be highly specific for PMMoV (Haramoto et al., 2013). The possibility of effective use of these primers in the formats of 2-stage classical reverse-transcription PCR and 2-stage Eva Green reverse-transcription RT-PCR was established.

CONCLUSION

Based on the results of testing seven test systems for ELISA for TMV, ToMV, ToBRFV, TMGMV and PMMoV from several manufacturers, insufficiently high specificity of most of them to target objects was established. An exception is the TMV ELISA test system from Loewe (Germany), which can be used both for screening tests and for TMV identification. The rest of the test systems should be used only for preliminary screening tests for the presence of tobamoviruses with subsequent analysis of seropositive samples by PCR with species-specific primers.

It has been established that to detect the tobamovirus complex on vegetable crops, it is advisable to use the universal primers TobRT up1/TobRT do2 (Dovas et al., 2004), which are characterized by the widest

наиболее широким спектром действия. Для выявления TMV, ToMV и TMGMV на пасленовых овощных культурах целесообразно использовать универсальные праймеры Tob-Uni2 F/Tob-Uni1 R (Alishiri et al., 2013), TobamoF/TobamoR (Li et al., 2014) и TOBAMO-S1/TOBAMO-AS1 (Menzel et al., 2019), а также диагностический набор «Tobamovirus Group PCR Primer Mix».

Проведена отработка дуплексного теста для одновременного выявления TMV и ToMV, а также мультиплексного теста для одновременного выявления TMV, ToBRFV и ToMV. Проведенные эксперименты с использованием мультиплексной ПЦР свидетельствуют о несомненной перспективности мультиплексного теста по методике Yan et al. (2021) и целесообразности проведения дополнительных исследований.

Для объективной диагностики TMV, ToMV и TMGMV проведено испытание шести, пяти и двух пар видоспецифичных праймеров соответственно. Определены высокоспецифичные праймеры, реагирующие лишь с изолятами целевых объектов. К их числу относятся праймеры TMV 8PF-1/TMV 3PR и ToMV-2PF/ToMV-1PR, разработанные в ФГБУ «ВНИИКР».

Благодарность. Авторы выражают свою признательность сотрудникам научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР» за помощь в проведении исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чанг Н.Х.Т.К. Распространение и патогенез вирусных заболеваний томата в условиях Вьетнама и России: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – М., 2013. – 22 с.
2. Adams M., Heinze C., Jackson A., Kreuze J., Macfarlane S., Torrance L., 2012. Genus *Tobamovirus*. In: King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. (ed). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. – Elsevier Academic Press, London, United Kingdom: 1153–1156.
3. Alishiri A., Rakhshandehroo F., Zamanizadeh H.-R., & Palukaitis P., 2013. Prevalence of Tobacco mosaic virus in Iran and evolutionary analyses of the coat protein gene. – The Plant Pathology Journal, 29 (3): 260–273. URL: <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.09.2012.0145>.
4. Broadbent L., Fletcher J.T., 1963. The epidemiology of tomato mosaic: IV. Persistence of virus on clothing and glasshouse structures. – Annals of Applied Biology, 52: 233–241.
5. Castello J., Lakshman D., Tavantzis S., Rogers S., Bachand G., Jagels R., Carlisle J., Liu Y., 1995. Detection of infectious Tomato mosaic tobamovirus in fog and clouds. – Ecology and Epidemiology, 85 (11): 1409–1412.
6. Castello J., Rogers S., Starmer W., Catranis C., Ma L., Bachand G., Zhao Y., Smith J., 1999. Detection of Tomato mosaic tobamovirus RNA in ancient glacial ice. – Polar Biology, 22: 207–212. URL: <https://doi.org/10.1007/s003000050411>.
7. Chen S., Gu H., Wang X., Chen J., Zhu W., 2011. Multiplex RT-PCR detection of Cucumber mosaic virus

spectrum of action. To detect TMV, ToMV and TMGMV on Solanaceae, it is advisable to use universal primers Tob-Uni2 F/Tob-Uni1 R (Alishiri et al., 2013), TobamoF/TobamoR (Li et al., 2014) and TOBAMO-S1/TOBAMO-AS1 (Menzel et al., 2019), as well as the diagnostic kit “Tobamovirus Group PCR Primer Mix”.

A duplex test for the simultaneous detection of TMV and ToMV, as well as a multiplex test for the simultaneous detection of TMV, ToBRFV and ToMV, were developed. The experiments performed using multiplex PCR indicate the undoubted promise of the multiplex test according to the method of Yan et al. (2021) and the feasibility of additional research.

For an objective diagnosis of TMV, ToMV, and TMGMV, six, five, and two pairs of species-specific primers, respectively, were tested. Highly specific primers that react only with target object isolates have been determined. These include primers TMV 8PF-1/TMV 3PR and ToMV-2PF/ToMV-1PR, developed at VNIICR.

Acknowledgement. The authors express their gratitude to the staff of Virology and Bacteriology Research and Methodology Department, FGBU “VNIICR” for their help in conducting research.

REFERENCES

1. Chang N.H.T.K. Distribution and pathogenesis of viral diseases of tomato in the conditions of Vietnam and Russia: Ph.D. diss. ... cand. biol. Sciences. M., 2013; 22 p.
2. Adams M., Heinze C., Jackson A., Kreuze J., Macfarlane S., Torrance L. Genus *Tobamovirus*. In: King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. (ed). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, London, United Kingdom, 2012: 1153–1156.
3. Alishiri A., Rakhshandehroo F., Zamanizadeh H.-R., & Palukaitis P. Prevalence of Tobacco mosaic virus in Iran and evolutionary analyses of the coat protein gene. *The Plant Pathology Journal*, 2013; 29 (3): 260–273. URL: <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.09.2012.0145>.
4. Broadbent L., Fletcher J.T. The epidemiology of tomato mosaic: IV. Persistence of virus on clothing and glasshouse structures. *Annals of Applied Biology*, 1963; 52: 233–241.
5. Castello J., Lakshman D., Tavantzis S., Rogers S., Bachand G., Jagels R., Carlisle J., Liu Y. Detection of infectious Tomato mosaic tobamovirus in fog and clouds. *Ecology and Epidemiology*, 1995; 85 (11): 1409–1412.
6. Castello J., Rogers S., Starmer W., Catranis C., Ma L., Bachand G., Zhao Y., Smith J. Detection of Tomato mosaic tobamovirus RNA in ancient glacial ice. *Polar Biology*, 1999; 22: 207–212. URL: <https://doi.org/10.1007/s003000050411>.
7. Chen S., Gu H., Wang X., Chen J., Zhu W. Multiplex RT-PCR detection of Cucumber mosaic virus subgroups and Tobamoviruses infecting Tomato using 18S rRNA as an internal control. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 2011; 43: 465–471.

subgroups and Tobamoviruses infecting Tomato using 18S rRNA as an internal control. – *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 43: 465–471.

8. Dovas C., Efthimiou K., Katis N., 2004. Generic detection and differentiation of tobamoviruses by a spot nested RT-PCR-RFLP using dI-containing primers along with homologous dG-containing primers. – *J. Virol. Methods*, 117: 137–144.

9. Gumus M., Paylan I., 2013. Detection of viruses in seeds of some vegetables by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). – *African Journal of Biotechnology*, 12 (25): 3891–3897.

10. Hančinský R., Mihálik D., Mrkvová M., Candresse T., Glasa M., 2020. Plant viruses infecting Solanaceae family members in the cultivated and wild environments: a review. – *Plants*, 9 (5): 667. URL: <https://doi.org/10.3390/plants9050667>.

11. Haramoto E., Kitajima M., Kishida N., Konno Y., Katayama H., Asami M., Akiba M., 2013. Occurrence of Pepper Mild Mottle Virus in Drinking Water Sources in Japan. – *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (23): 7413–7418.

12. Kegler H., Fuchs E., Knapp H.D., Ehrig F., 1994. Untersuchungen zum vorkommen pflanzenpathogener Viren im Naturschutzgebiet Insel Vilm (Biosphärenreservat Südost-Rügen). – *Arch Phytopathol Plant Protect*, 29: 211–216.

13. Kim J., Choi G., Kim J., Lee S., Choi J., Ryu K., 2006. Development of single-tube multiplex immunocapture RT-PCR assay for simultaneous detection of two pepper tobamoviruses. – *Plant Pathol. J.*, 22: 164–167.

14. Kumar S., Shankar A., Nayaka S., Lund O., Prakash H., 2011. Detection of Tobacco mosaic virus and Tomato mosaic virus in pepper and tomato by multiplex RT-PCR. – *Letters in Applied Microbiology*, 53 (3): 359–363.

15. Letschert B., Adam G., Lesemann D., Willingmann P., Heinze C., 2002. Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. – *J. Virol. Methods*, 106: 1–10. URL: [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(02\)00135-0](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(02)00135-0).

16. Levitzky N., Smith E., Lachman O., Luria N., Mizrahi Y. et al., 2019. The bumblebee *Bombus terrestris* carries a primary inoculum of Tomato brown rugose fruit virus contributing to disease spread in tomatoes. – *PLOS ONE*, 14 (1): e0210871. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210871>.

17. Li Y., Wang C., Xiang D., Li R., Liu Y., Li F., 2014. First Report of Tomato mottle mosaic virus infection of pepper in China. – *Plant Disease*, 98 (10): 1447.

18. Li Y., Wang Y., Hu J., Xiao L., Tan G., Lan P., Liu Y., Li F., 2017. The complete genome sequence, occurrence and host range of Tomato mottle mosaic virus Chinese isolate. – *Virology Journal*, 14: 15: 1–9. URL: <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0676-2>.

19. Lucas G., 1975. Diseases of tobacco, 3rd Edition. – Raleigh, North Carolina, USA: Biological Consulting Associates. 621 p.

20. Menzel W., Knierim D., Winter S., Hamacher J., Heupel M., 2019. First report of Tomato brown rugose fruit virus infecting tomato in Germany. – *New Disease Reports*, 39: 1. URL: <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.039.001>.

21. Reingold V., Lachman O., Belausov E., Koren A., Mor N., Dombrovsky A., 2016. Epidemiological

8. Dovas C., Efthimiou K., Katis N. Generic detection and differentiation of tobamoviruses by a spot nested RT-PCR-RFLP using dI-containing primers along with homologous dG-containing primers. *J. Virol. Methods*, 2004; 117: 137–144.

9. Gumus M., Paylan I. Detection of viruses in seeds of some vegetables by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *African Journal of Biotechnology*, 2013; 12 (25): 3891–3897.

10. Hančinský R., Mihálik D., Mrkvová M., Candresse T., Glasa M. Plant viruses infecting Solanaceae family members in the cultivated and wild environments: a review. *Plants*, 2020; 9 (5): 667. URL: <https://doi.org/10.3390/plants9050667>.

11. Haramoto E., Kitajima M., Kishida N., Konno Y., Katayama H., Asami M., Akiba M. Occurrence of Pepper Mild Mottle Virus in Drinking Water Sources in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013; 79 (23): 7413–7418.

12. Kegler H., Fuchs E., Knapp H.D., Ehrig F. Untersuchungen zum vorkommen pflanzenpathogener Viren im Naturschutzgebiet Insel Vilm (Biosphärenreservat Südost-Rügen). *Arch Phytopathol Plant Protect*, 1994; 29: 211–216.

13. Kim J., Choi G., Kim J., Lee S., Choi J., Ryu K. Development of single-tube multiplex immunocapture RT-PCR assay for simultaneous detection of two pepper tobamoviruses. *Plant Pathol. J.*, 2006; 22: 164–167.

14. Kumar S., Shankar A., Nayaka S., Lund O., Prakash H. Detection of Tobacco mosaic virus and Tomato mosaic virus in pepper and tomato by multiplex RT-PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 2011; 53 (3): 359–363.

15. Letschert B., Adam G., Lesemann D., Willingmann P., Heinze C. Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. *J. Virol. Methods*, 2002; 106: 1–10. URL: [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(02\)00135-0](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(02)00135-0).

16. Levitzky N., Smith E., Lachman O., Luria N., Mizrahi Y. et al., The bumblebee *Bombus terrestris* carries a primary inoculum of Tomato brown rugose fruit virus contributing to disease spread in tomatoes. *PLOS ONE*, 2019; 14 (1): e0210871. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210871>.

17. Li Y., Wang C., Xiang D., Li R., Liu Y., Li F. First Report of Tomato mottle mosaic virus infection of pepper in China. *Plant Disease*, 2014; 98 (10): 1447.

18. Li Y., Wang Y., Hu J., Xiao L., Tan G., Lan P., Liu Y., Li F. The complete genome sequence, occurrence and host range of Tomato mottle mosaic virus Chinese isolate. *Virology Journal*, 2017; 14: 15: 1–9. URL: <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0676-2>.

19. Lucas G. Diseases of tobacco, 3rd Edition. Raleigh, North Carolina, USA: Biological Consulting Associates, 1975; 621 p.

20. Menzel W., Knierim D., Winter S., Hamacher J., Heupel M. First report of Tomato brown rugose fruit virus infecting tomato in Germany. *New Disease Reports*, 2019; 39: 1. URL: <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.039.001>.

21. Reingold V., Lachman O., Belausov E., Koren A., Mor N., Dombrovsky A. Epidemiological study

study of Cucumber green mottle mosaic virus in greenhouses enables reduction of disease damage in cucurbit production. – *Annals of Applied Biology*, 168: 29–40.

22. Sharma P., Verma R., Mishra R., Sahu A., Choudhary D., Gaur R., 2014. First report of Cucumber green mottle mosaic virus association with the leaf green mosaic disease of a vegetable crop, *Luffa acutangula* L. – *Acta virologica*, 58: 299–300. URL: https://doi.org/10.4149/av_2014_03_299.

23. Smith E., Dombrovsky, A. 2019. Aspects in *Tobamovirus* Management in Intensive Agriculture. In: (Ed.), *Plant Diseases – Current Threats and Management Trends*. IntechOpen. URL: <https://doi.org/10.5772/intechopen.87101>.

24. Yan Z., Zhao M., Ma H., Liu L., Yang G., Geng C., Tian Y., Li X., 2021. Biological and molecular characterization of Tomato brown rugose fruit virus and development of quadruplex RT-PCR detection. – *Journal of Integrative Agriculture*, 20 (7): 1871–1879.

25. Yang J., Wang F., Chen D., Shen L., Qian Y., Liang Z., Zhou W., Ya T., 2012. Development of a one-step immunocapture Real-time RT-PCR assay for detection of Tobacco mosaic virus in soil. – *Sensors* (Basel, Switzerland), 12: 16685–16694. URL: <https://doi.org/10.3390/s121216685>.

26. Zhu P.-X., Zhang Q.-P., Ji Z.-L., Zhu F., 2020. First report of Tobacco mosaic virus infecting *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl. var. *clavata* Makino in China. – *Journal of Plant Pathology*, 102: 1293. URL: <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00574-7>.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Лозовая Евгения Николаевна, научный сотрудник отдела аспирантуры ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; e-mail: evgeniyaf@mail.ru.

Приходько Юрий Николаевич, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru.

Живаева Татьяна Степановна, научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru.

Шнейдер Юрий Андреевич, кандидат биологических наук, начальник научно-методического и экспериментального центра, ведущий научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0002-7565-1241, e-mail: yury.shneyder@mail.ru.

Каримова Елена Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник – начальник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0001-6474-8913, e-mail: elenavkar@mail.ru.

of Cucumber green mottle mosaic virus in greenhouses enables reduction of disease damage in cucurbit production. *Annals of Applied Biology*, 2016; 168: 29–40.

22. Sharma P., Verma R., Mishra R., Sahu A., Choudhary D., Gaur R. First report of Cucumber green mottle mosaic virus association with the leaf green mosaic disease of a vegetable crop, *Luffa acutangula* L. *Acta virologica*, 2014; 58: 299–300. URL: https://doi.org/10.4149/av_2014_03_299.

23. Smith E., Dombrovsky, A. Aspects in *Tobamovirus* Management in Intensive Agriculture. In: (Ed.), *Plant Diseases – Current Threats and Management Trends*. IntechOpen, 2019. URL: <https://doi.org/10.5772/intechopen.87101>.

24. Yan Z., Zhao M., Ma H., Liu L., Yang G., Geng C., Tian Y., Li X. Biological and molecular characterization of Tomato brown rugose fruit virus and development of quadruplex RT-PCR detection. *Journal of Integrative Agriculture*, 2021; 20 (7): 1871–1879.

25. Yang J., Wang F., Chen D., Shen L., Qian Y., Liang Z., Zhou W., Ya T. Development of a one-step immunocapture Real-time RT-PCR assay for detection of Tobacco mosaic virus in soil. *Sensors* (Basel, Switzerland), 2021; 12: 16685–16694. URL: <https://doi.org/10.3390/s121216685>.

26. Zhu P.-X., Zhang Q.-P., Ji Z.-L., Zhu F. First report of Tobacco mosaic virus infecting *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl. var. *clavata* Makino in China. *Journal of Plant Pathology*, 2020; 102: 1293. URL: <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00574-7>.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Evgenia Lozovaya, Researcher of Post-Graduate Studies Department, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; e-mail: evgeniyaf@mail.ru.

Yuri Prikhodko, PhD in Agriculture, Leading Researcher, Research and Methodology Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru.

Tatiana Zhivaeva, Researcher, Research and Methodology Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru.

Yuri Shneyder, PhD in Biology, Head of Research and Methodology and Experimental Center, Leading Researcher, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0002-7565-1241, e-mail: yury.shneyder@mail.ru.

Elena Karimova, PhD in Biology, Senior Researcher, Head of Research and Methodology Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0001-6474-8913, e-mail: elenavkar@mail.ru.