

Диагностика вирусов рода *Begomovirus*

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

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

АННОТАЦИЯ

Род *Begomovirus* – один из наиболее крупных среди родов фитопатогенных вирусов. Представители этого рода заражают двудольные растения и передаются табачной белокрылкой. Ранее этот род был известен также как подгруппа III геминивирусов, или группа вируса золотистой мозаики бобов. Вирус желтой курчавости листьев томата (TYLCV), вирус желтой курчавости листьев томата Сардиния (TYLCSV), вирус курчавости листьев томата Нью-Дели (ToLCNDV) входят в состав рода *Begomovirus* и являются опасными патогенами овощных культур в открытом и защищенном грунте. Все эти вирусы отсутствуют на территории Российской Федерации, а TYLCV включен в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза (ЕАЭС). Потери урожая томата, перца, цуккини и других овощных культур в результате заражения этими патогенами могут достигать 100%. Своевременное выявление зараженных растений имеет важнейшее значение для предотвращения проникновения вирусов на территорию РФ и их распространения на ней. Объективное выявление особо опасных вирусов рода *Begomovirus* и их идентификация до уровня рода и вида возможны лишь на основе использования современных методов лабораторной диагностики. В ходе исследований авторами статьи протестированы 7 пар универсальных и 4 пары видоспецифичных праймеров для проведения классической полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ПЦР в реальном времени. Определены праймеры, позволяющие проводить универсальное выявление комплекса бегомовирусов на овощных культурах. Проведена отработка мультиплексной ПЦР для выявления и идентификации TYLCV и TYLCSV одновременно. Авторами статьи разработаны праймеры, характеризующиеся высокой специфичностью к TYLCV и TYLCSV.

Ключевые слова. Бегомовирусы, выявление и идентификация, полимеразная цепная реакция, тест-системы, праймеры, TYLCV, TYLCSV, ToLCNDV.

Diagnosis of viruses of the genus *Begomovirus*

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

FGBY "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

ABSTRACT

The genus *Begomovirus* is one of the largest among the genera of phytopathogenic viruses. Representatives of this genus infect dicotyledonous plants and are transmitted by the silverleaf whitefly. Previously, this genus was also known as subgroup III of the geminiviruses, or the Bean golden mosaic virus group. Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), Tomato Yellow Leaf Curl Sardinia Virus (TYLCSV), Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) belong to the genus *Begomovirus* and are serious pathogens of vegetable crops in open and protected ground. All these viruses are absent on the territory of the Russian Federation, and TYLCV is included in the Common List of Quarantine Pests of the Eurasian Economic Union (EAEU). Yield losses of tomato, pepper, zucchini and other vegetable crops as a result of infection with these pathogens can reach 100%. Timely detection of infected plants is essential to prevent the entry of viruses into the territory of the Russian Federation and their spread on it. Objective detection of especially dangerous viruses of the *Begomovirus* genus and their identification to the level of genus and species is possible only through the use of modern methods of laboratory diagnostics. During the research, the authors of the article tested 7 pairs of universal and 4 pairs of species-specific primers for classical polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. Primers have been identified that allow universal detection of the begomovirus complex on vegetable crops. Multiplex PCR was tested to detect and identify TYLCV and TYLCSV simultaneously. The authors of the article developed primers with high specificity for TYLCV and TYLCSV.

Key words. Begomoviruses, detection and identification, polymerase chain reaction, test systems, primers, TYLCV, TYLCSV, ToLCNDV.

ВВЕДЕНИЕ



а последнюю четверть века для мирового сельского хозяйства особое значение приобрели вирусы, распространяющиеся белокрылками и трипсами. Прежде всего это относится к представителям рода *Begomovirus*, основным переносчиком которых является табачная белокрылка

Bemisia tabaci.

Род *Begomovirus* входит в семейство Geminiviridae. Геминивирусы – это семейство небольших (по величине вирионов) вирусов растений, геномы которых содержат одну или две одноцепочечные кольцевые ДНК размером 2,5–5,2 тысячи пар нуклеотидов (п. н.).

Род *Begomovirus* является самым крупным в семействе Geminiviridae. В настоящее время он включает 425 видов (EPPO, 2022). 133 вида этого рода поражают томат, по крайней мере 34 встречаются на различных видах и подвидах культурного перца, на тыквенных известны 27 видов бегомовирусов, а на бобовых культурах – 31 вид.

Первоначально, на основании сравнения полногеномных последовательностей, все известные виды бегомовирусов были разделены на 6 групп, взаимосвязанных с их географическим распространением: 1) группа Ближнего Востока и Центральной Азии; 2) группа Западного Средиземноморья; 3) группа Индийского субконтинента; 4) группа Северной Африки и Сахары; 5) группа Восточной, Юго-Восточной Азии и Австралии; 6) группа Западного полушария, включая США, Мексику, Центральную Америку, Южную Америку и Карибские острова, за исключением изолятов TYLCV средиземноморского происхождения, распространившихся в этом регионе (Brown, 2010).

Позднее группой авторов проведен анализ 3123 полноразмерных последовательностей ДНК-А различных бегомовирусов, доступных в базах данных по состоянию на декабрь 2012 г. На основании этого анализа предложена новая классификация рода *Begomovirus*, включающая 38 подгрупп (Brown et al., 2015).

TYLCV и TYLCSV входят в Перечень карантинных вредных организмов Европейской и Средиземноморской организации по карантину и защите растений (ЕОКЗР), а TYLCV – в Единый перечень карантинных объектов ЕАЭС. ToLCNDV входит в Сигнальный перечень ЕОКЗР, поэтому подкарантинный материал восприимчивых растений-хозяев целесообразно тестировать на наличие этих видов вредоносных бегомовирусов. Одним из путей уменьшения количества и трудоемкости тестов является использование технологии мультиплексной ПЦР, которая позволяет одновременно диагностировать не менее двух объектов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на базе научного подразделения ФГБУ «ВНИИКР». Основными объектами исследований являлись следующие представители рода *Begomovirus*, заражающие овощные культуры: вирус желтой курчавости листьев томата (TYLCV), вирус желтой курчавости листьев томата Сардиния (TYLCSV), вирус курчавости листьев томата Нью-Дели (ToLCNDV), вирус мозаики африканской

INTRODUCTION

Over the past 25 years, viruses spread by whiteflies and thrips have acquired particular importance for world agriculture. First of all, this applies to representatives of the genus *Begomovirus*, the main vector of which is the silverleaf whitefly *Bemisia tabaci*.

The genus *Begomovirus* belongs to the family Geminiviridae. Geminiviruses are a family of small (virion-sized) plant viruses whose genomes contain one or two single-stranded circular DNAs 2.5–5.2 kb in size.

The genus *Begomovirus* is the largest in the family Geminiviridae. It currently includes 425 species (EPPO, 2022). 133 species of this genus infect tomato, at least 34 occur on various species and subspecies of cultivated pepper, 27 species of begomoviruses are known on cucurbits, and 31 species on legumes.

Initially, based on a comparison of genome-wide sequences, all known begomovirus species were divided into 6 groups, interconnected with their geographical distribution: 1) the group of the Middle East and Central Asia; 2) Western Mediterranean group; 3) Indian subcontinent group; 4) group of North Africa and Sahara; 5) group of East, Southeast Asia and Australia; 6) Western Hemisphere group including USA, Mexico, Central America, South America and the Caribbean, excluding TYLCV isolates of Mediterranean origin that have spread in this region (Brown, 2010).

Later, a group of authors analyzed 3123 full-length DNA-A sequences of various begomoviruses available in databases as of December 2012. Based on this analysis, a new classification of the *Begomovirus* genus was proposed, including 38 subgroups (Brown et al., 2015).

TYLCV and TYLCSV are included in the List of Quarantine Pests of the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO), and TYLCV is included in the Common List of Quarantine Pests of the EAEU. ToLCNDV is on the EPPO Alert List, so regulated material from susceptible hosts should be tested for these harmful begomovirus species. One of the ways to reduce the number and complexity of tests is to use multiplex PCR technology, which allows you to simultaneously diagnose at least two objects.

MATERIALS AND METHODS

The studies were carried out on the basis of the scientific division of FGBU «VNIICR». The main objects of research were the following representatives of the genus *Begomovirus* that infect vegetable crops: Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), Tomato Yellow Leaf Curl Sardinia Virus (TYLCSV), Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV), African cassava mosaic virus (ACMV), Bean golden mosaic virus (BGMV) and Watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV). The experiments were carried out with the following reference begomovirus isolates from the DSMZ collection (Germany): TYLCV PC-0560, TYLCV PV-0844, TYLCV PC-0588, TYLCSV PV-0561, TYLCSV PC-0596, ToLCNDV PC-1109, ToLCNDV PC-1111, ACMV PC-0873, BGMV PC-0094, BGMV PV-0462, WmCSV PC-0830, as well as with a positive control for ELISA to TYLCV by Adgen (Great Britain) and isolate Kaz-1 (VNIICR).

Таблица 1
Характеристика праймеров, испытанных в исследовании
Table 1
Characteristics of primers tested in the study

Название праймера Primer name	Объект, мишень в геноме Object, target in the genome	Последовательность 5'→3' Sequence 5'→3'	Длина продукта (п. н.) Product length (bp)	Температура отжига (°C), t °C Temperature of annealing (°C), t °C	Автор Author
GemCP-V-5' (A1GemCP-V)	<i>Begomovirus</i> spp., ген белка оболочки ДНК-А	GGR TTN GAN GCR TGH GTA CAY G	600	58	Lecoq, Desbiez, 2012
GemCP-C-3' (A1GemCP-V)	gene of coat protein DNA-A	GCC YAT RTA YAG RAA GCC MAG			
AV-494	<i>Begomovirus</i> spp., ген белка оболочки	GCC YAT RTA YAG ARA GCC MAG	550–575	60	Wyatt, Brown, 1996
AC-1048	ДНК-А gene of coat protein DNA-A	GGR TTD GAR GCA TGH GTA CAT G			
TY1-6F	<i>Begomovirus</i> spp., ген белка оболочки	GCC CAT GWA YMG RAA RCC	580	58	Saison, Gentit, 2015
TY1-3F	gene of coat protein	GCC CAT GTA YCG RAA RCC			
TY-2R	DNA-A	GGR TTA GAR GCA TGM GTA C			
Beg-CP-F	<i>Begomovirus</i> spp., ген белка оболочки	GCC CAT GTA YMG RAA RCC	580	58	Saison, Gentit, 2015
Beg-580-R	ДНК-А gene of coat protein DNA-A	GGR TTA GAR GCA TGM GTA CA	или 860		
Begomo-F3	Bipartite <i>Begomovirus</i> , ген белка оболочки	TCGAAGCGACCAGCAGAT	216	60	Naganur et al., 2019
Begomo-R3	ДНК-А gene of coat protein DNA-A	CTTACACGGGCCTTCACAG			
SPG1	<i>Begomovirus</i> spp., гены AC1 и AC2	CCCCGTGCGWRAATCCAT	922	60	Li et al., 2004
SPG2	genes AC1 and AC2	ATCCVAAYWTYCAGGGAGCTAA			
TY1(+)	<i>Begomovirus</i> spp., ген белка оболочки	GCCCATGTAYCGRAAGCC	580	59	Accotto et al., 2000
TY2(-)	ДНК-А gene of coat protein DNA-A	GGRTTAGARGCATGMGTAC			
TYLCSV-P3F	TYLCSV, ген белка оболочки	AAAGCCGCGGATGTACAGAA	433	60	HMOBB ВНИИКР* RMDVB VNIKR*
TYLCSV-P3R	gene of coat protein	CTTCATCCCTGACGGACCAC			
TYLCV-P1F	TYLCV, ген белка оболочки	AGGCATGCGTACATGCCATA	282	60	HMOBB ВНИИКР RMDVB VNIKR
TYLCV-P1R	gene of coat protein	GGCCCTATGGAAACAGTCCA			
TY-209F	TYLCSV	CTYGCAATWAAATATTTGCAGCTA	366	60	Pellegrin et al., 2008
TY-575R		CAACACCRGTATGCTTSACG			
TY-613F	TYLCV	GAATTACTCACAGAGTSGGTAAGA	750	60	
TY-1363R		GAACCACGACATCATTTCCA			

* Научно-методический отдел вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР».

* Research and Methodology Department of Virology and Bacteriology, FGBU "VNIKR".

Таблица 2
Условия проведения ПЦР

Набор	Термоциклический режим
5x Mas ^{DP} Mix-2025 (ЗАО «Диалат Лтд.», Россия)	95 °C – 5 мин, 35 циклов (95 °C – 30 сек, t °C отжига – 30 сек, 72 °C – 1 мин), 72 °C – 10 мин
ScreenMix-HS (ЗАО «Евроген», Россия)	95 °C – 5 мин, 35 циклов (95 °C – 15 сек, t °C отжига – 30 сек, 72 °C – 30 сек)
2,5x Mas ^{ZG} MIX-2025 (ЗАО «Диалат Лтд.», Россия)	94 °C – 3 мин, 35 циклов (94 °C – 30 сек, t °C отжига – 30 сек, 72 °C – 30 сек)
Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen, США)	95 °C – 15 мин, 35 циклов (94 °C – 30 сек, t °C отжига – 90 сек, 72 °C – 90 сек), 72 °C – 10 мин
Tomato yellow leaf curl disease-PB (ООО «НПФ Синтол», Россия)	Согласно инструкции фирмы-производителя

Примечание: t °C – температура отжига указана в таблице 1.

кассава (ACMV), вирус золотистой мозаики бобов (BGMV) и вирус хлоротической карликовости арбуза (WmCSV). Эксперименты проводили со следующими референтными изолятами бегомовирусов из коллекции DSMZ (Германия): TYLCV PC-0560, TYLCV PV-0844, TYLCV PC-0588, TYLCV PV-0561, TYLCV PC-0596, ToLCNDV PC-1109, ToLCNDV PC-1111, ACMV PC-0873, BGMV PC-0094, BGMV PV-0462, WmCSV PC-0830, а также с положительным контролем для ИФА к TYLCV фирмы Adgen (Великобритания) и изолятом Kaz-1 (ВНИИР).

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

Для проведения ПЦР использовали следующие наборы реагентов: «Qiagen Multiplex PCR Kit» (Qiagen, США), «ScreenMix-HS» (ЗАО «Евроген», Россия), «5x Mas^{DP}MIX-2025» (ЗАО «Диалат Лтд.», Россия), «2,5x Mas^{ZG}MIX-2025» (ЗАО «Диалат Лтд.», Россия), «Tomato yellow leaf curl disease-PB» (ООО «НПФ Синтол», Россия).

Последовательности праймеров указаны в таблице 1.

Термоциклические режимы приведены в таблице 2.

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. (Thermo Fisher Scientific, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы для выявления комплекса бегомовирусов были протестированы 7 пар универсальных праймеров (табл. 1).

По результатам проведенных испытаний была установлена различная специфичность

Table 2
Conditions for PCR

Kit	Thermal cycling mode
5x Mas ^{DP} Mix-2025 (Dialat Ltd., Russia)	95 °C – 5 min, 35 cycles (95 °C – 30 sec, t °C annealing – 30 sec, 72 °C – 1 min), 72 °C – 10 min
ScreenMix-HS (Evrogen, Russia)	95 °C – 5 min, 35 cycles (95 °C – 15 sec, t °C annealing – 30 sec, 72 °C – 30 sec)
2,5x Mas ^{ZG} MIX-2025 (Dialat Ltd., Russia)	94 °C – 3 min, 35 cycles (94 °C – 30 sec, t °C annealing – 30 sec, 72 °C – 30 sec)
Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen, USA)	95 °C – 15 min, 35 cycles (94 °C – 30 sec, t °C annealing – 90 sec, 72 °C – 90 sec), 72 °C – 10 min
Tomato yellow leaf curl disease-RT (Syntol, Russia)	According to the manufacturer's instructions

Note: t °C – temperature of annealing is shown in table 1.

Nucleic acids were isolated using the “Proba-NK” kit (AgroDiagnostics, Russia).

The following reagent kits were used for PCR: “Qiagen Multiplex PCR Kit” (Qiagen, USA), “ScreenMix-HS” (Evrogen, Russia); “5x Mas^{DP}MIX-2025” (Dialat Ltd., Russia), “2.5x Mas^{ZG}MIX-2025” (Dialat Ltd., Russia), “Tomato yellow leaf curl disease-RT” (Syntol, Russia).

Primer sequences are shown in Table 1.

Thermal cycling modes are shown in table 2.

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

PCR results were detected by electrophoresis in 1.5% agarose gel. The magnitude of the amplification products was measured using DNA molecular weight markers GeneRuler™ 100+ bp (Thermo Fisher Scientific, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

In the course of the work, 7 pairs of universal primers were tested to identify the begomovirus complex (Table. 1).

According to the results of the tests, different specificity of universal primers was established for Begomo-F3/Begomo-R3 (Naganur et al., 2019), GemCP-V-5'/GemCP-C-3' (Lecoq, Desbiez, 2012), TY1-6F/TY1-3F/TY1-2R (Saison, Gentit, 2015), SPG1/SPG2 (Li et al., 2004) (Fig. 1), Beg-CP-F/Beg-580-R (Saison, Gentit, 2015), AV-494/AC-1048 (Wyatt, Brown, 1996) and TY1(+)/TY2(–) (Accotto et al., 2000) by their relation with different representatives of the genus *Begomovirus*.

It was found that primers Begomo-F3/Begomo-R3 (Naganur et al., 2019) detect only ToLCNDV, ACMV and some TYLCV isolates and do not react with TYLCV isolates, while primers GemCP-V-5'/GemCP-C-3' react with TYLCV, ToLCNDV, ACMV and BGMV but do not react with TYLCV.

универсальных праймеров Begomo-F3/Begomo-R3 (Naganur et al., 2019), GemCP-V-5'/GemCP-C-3' (Lecoq, Desbiez, 2012), TY1-6F/TY1-3F/TY-2R (Saison, Gentit, 2015), SPG1/SPG2 (Li et al., 2004) (рис. 1), Beg-CP-F/Beg-580-R (Saison, Gentit, 2015), AV-494/AC-1048 (Wyatt, Brown, 1996) и TY1(+)/TY2(-) (Accotto et al., 2000) по отношению к различным представителям рода *Begomovirus*.

Установлено, что праймеры Begomo-F3/Begomo-R3 (Naganur et al., 2019) выявляют лишь ToLCNDV, ACMV и некоторые изоляты TYLCV и не реагируют с изолятами TYLCSV, а праймеры GemCP-V-5'/GemCP-C-3' реагируют с TYLCV, ToLCNDV, ACMV и BGMV, но не реагируют с TYLCSV.

В двух экспериментах с различными наборами реагентов для ПЦР праймеры Beg-CP-F/Beg-580-R (Saison, Gentit, 2015) реагировали со всеми испытуемыми изолятами TYLCV и TYLCSV, а также с изолятами BGMV и ACMV, но не выявляли изоляты ToLCNDV и WmCSV.

Праймеры SPG1/SPG2 (Li et al., 2004) избирательно реагируют с отдельными изолятами TYLCV и TYLCSV, но эффективно диагностируют изоляты ToLCNDV.

Праймеры AV-494/AC-1048 (Wyatt, Brown, 1996) эффективно выявляют изоляты TYLCV и ToLCNDV, но нестабильно выявляют TYLCSV.

Праймеры TY1(+)/TY2(-) (Accotto et al., 2000) диагностируют изоляты TYLCV и TYLCSV, но не реагируют с изолятами ACMV, BGMV и ToLCNDV.

Наименее узкой специализацией характеризуются праймеры TY1-6F/TY1-3F/TY-2R (Saison, Gentit, 2015), которые реагируют со всеми вышеперечисленными бегомовирусами (табл. 3).

Следующим этапом нашей работы являлась отработка мультиплексных тестов для одновременного выявления в одной реакционной смеси нескольких бегомовирусов. Исследования, проведенные с применением дуплексной ПЦР для одновременного выявления TYLCV и TYLCSV, показали, что праймеры TY-209F/TY-575R и TY-613F/TY-1363R высокоспецифичны к TYLCSV и TYLCV соответственно (Pellegrin et al., 2008). В экспериментах с набором реагентов «Qiagen Multiplex PCR Kit» (Qiagen, США) качественные специфические продукты амплификации были получены для обоих целевых вирусов как при их моноинфекции, так и при смешанной инфекции в различных сочетаниях. При проведении этого теста с набором реагентов «2,5x Mas^{2G}MIX-2025» (ЗАО «Диалат Лтд.», Россия) результаты не отличались от таковых при использовании набора реагентов «Qiagen Multiplex PCR Kit» (Qiagen, США),

In two experiments with different PCR reagent kits, primers Beg-CP-F/Beg-580-R (Saison, Gentit, 2015) reacted with all tested TYLCV and TYLCSV isolates, as well as with BGMV and ACMV isolates, but did not detect ToLCNDV isolates and WmCSV.

Primers SPG1/SPG2 (Li et al., 2004) selectively react with individual TYLCV and TYLCSV isolates but effectively diagnose ToLCNDV isolates.

Primers AV-494/AC-1048 (Wyatt and Brown, 1996) efficiently detect TYLCV and ToLCNDV isolates, but are unstable at detecting TYLCSV.

Primers TY1(+)/TY2(-) (Accotto et al., 2000) diagnose TYLCV and TYLCSV isolates but do not react with ACMV, BGMV, and ToLCNDV isolates.

Primers TY1-6F/TY1-3F/TY-2R (Saison, Gentit, 2015), which react with all of the above begomoviruses, are characterized by the least narrow specialization (Table 3).

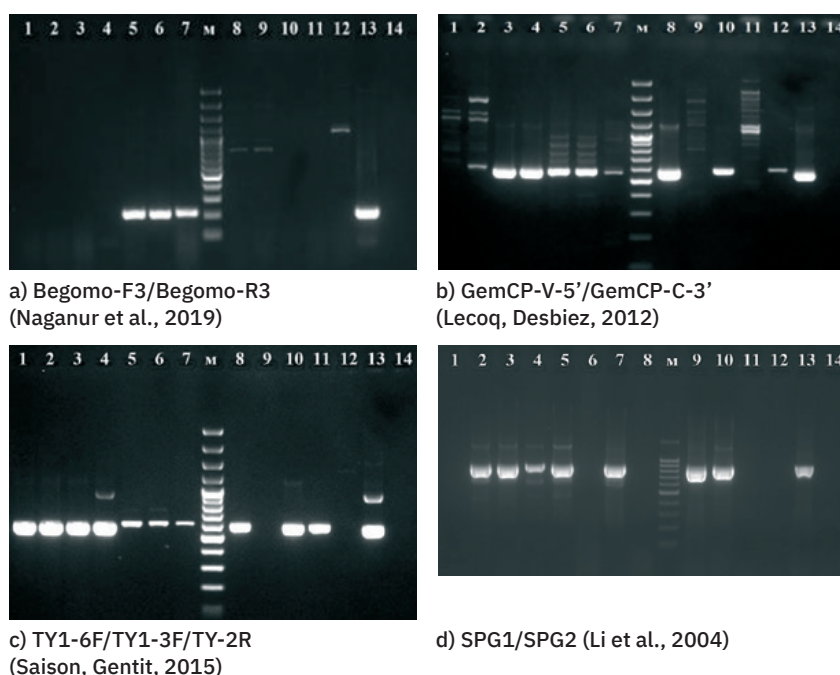


Рис. 1. Электрофореграмма. Результаты испытания универсальных праймеров с референтными изолятами различных бегомовирусов. Выделение ДНК – набором «Проба-НК» (ООО «АгроДиагностика», Россия), проведение ПЦР – набором «5x Mas^{2G}Mix-2025» (ЗАО «Диалат Лтд.», Россия). Образцы: 1 – изолят TYLCSV PV-0561; 2 – изолят TYLCSV PC-0596; 3 – изолят TYLCV PC-0560; 4 – изолят TYLCV PV-0844; 5 – изолят ToLCNDV PC-1109; 6 – изолят ToLCNDV PC-1111; 7 – изолят ACMV PC-0873; 8 – изолят BGMV PV-0462; 9 – изолят BGMV PC-0094 (все – DSMZ); 10 – изолят TYLCV Kaz-1 (ВНИИКР); 11–12 – листья растений томата с симптомами бегомовирусной инфекции; 13 – положительный контроль к TYLCV (Adgen); 14 – отрицательный контроль (вода), М – маркер молекулярного веса.

Fig. 1. Electrophoregram. Results of testing universal primers with reference isolates of various begomoviruses. Isolation of DNA – with the “Proba-NK” kit (AgroDiagnostica, Russia), PCR – with the kit “5x Mas^{2G}Mix-2025” (Dialat Ltd., Russia). Samples: 1 – isolate of TYLCSV PV-0561; 2 – isolate of TYLCSV PC-0596; 3 – isolate of TYLCV PC-0560; 4 – isolate of TYLCV PV-0844; 5 – isolate of ToLCNDV PC-1109; 6 – isolate of ToLCNDV PC-1111; 7 – isolate of ACMV PC-0873; 8 – isolate of BGMV PV-0462; 9 – isolate of BGMV PC-0094 (all – DSMZ); 10 – isolate of TYLCV Kaz-1 (VNIIEK); 11–12 – tomato leaves with symptoms of begomovirus infection; 13 – positive control to TYLCV (Adgen); 14 – negative control (water), M – molecular weight marker.

Таблица 3

Итоговая таблица результатов испытаний универсальных праймеров с изолятами изучаемых бегомовирусов

Table 3

Summary table of test results for universal primers with isolates of studied begomoviruses

Объект Object	Праймеры Primers						
	Begomo-F3/ Begomo-R3	GemCP-V-5' (A1GemCP-V)/ GemCP-C-3' (A1GemCP-V)	TY1-6F/ TY1-3F/TY-2R	SPG1/ SPG2	Beg-CP-F/ Beg-580-R	AV-494/ AC-1048	TY1(+)/ TY2(-)
TYLCV PC-0560	—	+	+	+	+	+	+
TYLCV PV-0844	—	+	+	+	+	+	+
TYLCV PC-0588	—	—	+	—	+	+	+
TYLCSV PV-0561	—	—	+	+	+	+	+
TYLCSV PC-0596	—	+	+	+	+	+	+
ToLCNDV PC-1109	+	+	+	+	—	+	—
ToLCNDV PC-1111	+	+	+	+	—	+	—
ACMV PC-0873	+	+	+	—	+	—	—
BGMV PC-0094	—	+	+	+	—	+	—
WmCSV PC-0830	—	—	+	—	—	—	—
TYLCV, +K (Adgen)	—	—	+	—	—	—	—
TYLCV Kaz-1	—	—	+	+	+	+	—
Отрицательный контроль (вода) Negative control (water)	—	—	—	—	—	—	—

«+» – положительный сигнал; «–» – отрицательный сигнал.
“+” – positive signal; “–” – negative signal.

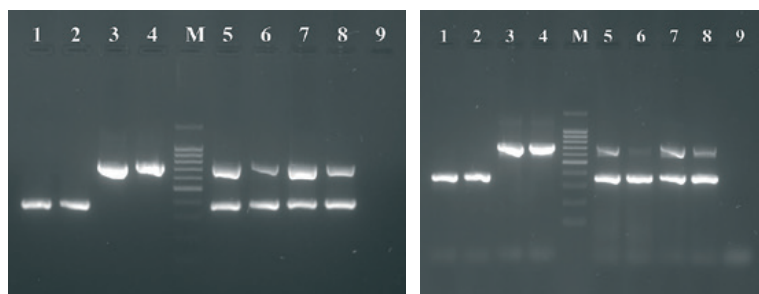
что свидетельствует о высокой воспроизводимости этого теста (рис. 2).

Праймеры TYLCV-P1F/TYLCV-P1R и TYLCSV-P3F/TYLCSV-P3R были разработаны авторами для специфического выявления вируса желтой курчавости листьев томата и вируса желтой курчавости листьев томата Сардиния. Эксперименты, проведенные с ними ранее, показали высокую эффективность этих праймеров, но по технологии дуплексной ПЦР они ранее не испытывались.

При постановке теста с праймерами TYLCV-P1F/TYLCV-P1R + TYLCSV-P3F/TYLCSV-P3R (НМОВБ ВНИИКР) установлено, что эти праймеры позволяют эффективно диагностировать изоляты TYLCV и TYLCSV как при их моноинфекции, так и в смеси в различных сочетаниях. Однако положительный сигнал для изолята TYLCV PV-0844 был слабым (рис. 3). Для получения более качественных продуктов амплификации и повышения чувствительности данный тест нуждается в дальнейшей доработке.

В ходе эксперимента было проведено испытание набора реагентов для ПЦР-РВ к TYLCV и TYLCSV «Tomato yellow leaf curl disease-PB» (ООО «НПФ Синтол», Россия).

В спецификации фирмы-производителя указано, что набор реагентов «Tomato yellow leaf curl disease-PB» позволяет одновременно выявлять в одной реакционной смеси специфичный для Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) фрагмент гена (по каналу флуоресценции



а) QiaGen Multiplex PCR Kit (QiaGen, США)

б) 2,5x MasZ MIX-2025 (ЗАО «Диалат Лтд.»., Россия) (Dialat Ltd., Russia)

Рис. 2. Электрофореграмма. Результаты дуплексного теста для одновременного выявления TYLCV и TYLCSV с праймерами TY-209F/TY-575R (к TYLCSV) и TY-613F/TY-1363R (к TYLCV) (Pellegrin et al., 2008).

Образцы: 1 – TYLCSV PV-0561; 2 – TYLCSV PC-0596; 3 – TYLCV PC-0560; 4 – TYLCV PV-0844; 5 – TYLCSV PV-0561 + TYLCV PC-0560; 6 – TYLCSV PV-0561 + TYLCV PV-0844; 7 – TYLCSV PC-0596 + TYLCV PC-0560; 8 – TYLCSV PC-0596 + TYLCV PV-0844; 9 – отрицательный контроль (вода); М – маркер молекулярного веса.

Fig. 2. Electropherogram. Results of a duplex test for simultaneous detection of TYLCV and TYLCSV with primers TY-209F/TY-575R (for TYLCSV) and TY-613F/TY-1363R (for TYLCV) (Pellegrin et al., 2008).

Samples: 1 – TYLCSV PV-0561; 2 – TYLCSV PC-0596; 3 – TYLCV PC-0560; 4 – TYLCV PV-0844; 5 – TYLCSV PV-0561 + TYLCV PC-0560; 6 – TYLCSV PV-0561 + TYLCV PV-0844; 7 – TYLCSV PC-0596 + TYLCV PC-0560; 8 – TYLCSV PC-0596 + TYLCV PV-0844; 9 – negative control (water); M – molecular weight marker.

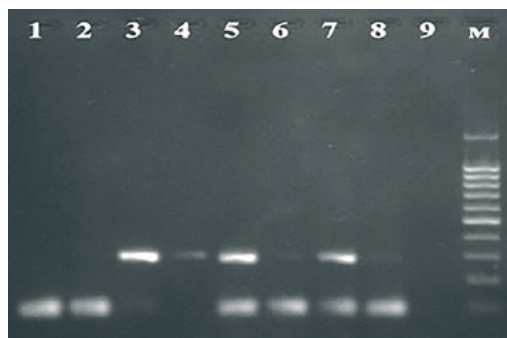


Рис. 3. Электрофореграмма. Результаты дуплексного теста для одновременного выявления TYLCV и TYLCSV с праймерами TYLCV- P1F/TYLCV-P1R (НМОВБ ВНИИКР) и TYLCSV-P3F/TYLCSV-P3R (НМОВБ ВНИИКР). Образцы: 1 – TYLCV PV-0561; 2 – TYLCV PC-0596; 3 – TYLCV PC-0560; 4 – TYLCV PV-0844; 5 – TYLCSV PV-0561 + TYLCV PC-0560; 6 – TYLCSV PV-0561 + TYLCV PV-0844; 7 – TYLCSV PC-0596 + TYLCV PC-0560; 8 – TYLCSV PC-0596 + TYLCV PV-0844; 9 – отрицательный контроль (вода); М – маркер молекулярного веса.

Fig. 3. Electrophoregram. Results of a duplex test for simultaneous detection of TYLCV and TYLCSV with primers TYLCV-P1F/TYLCV-P1R (RMDVB VNIKR) and TYLCSV-P3F/TYLCSV-P3R (RMDVB VNIKR). Samples: 1 – TYLCSV PV-0561; 2 – TYLCSV PC-0596; 3 – TYLCV PC-0560; 4 – TYLCV PV-0844; 5 – TYLCSV PV-0561 + TYLCV PC-0560; 6 – TYLCSV PV-0561 + TYLCV PV-0844; 7 – TYLCSV PC-0596 + TYLCV PC-0560; 8 – TYLCSV PC-0596 + TYLCV PV-0844; 9 – negative control (water); M – molecular weight marker.

FAM/Green) и специфичный для Tomato yellow leaf curl Axarquia virus (TYLCAV), Tomato yellow leaf curl Malaga virus (TYLCMA), Tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV) фрагмент гена (по каналу флуоресценции ROX/Orange), а также внутренний положительный контроль (по каналу флуоресценции R6G/HEX).

Проведенное испытание подтвердило, что набор реагентов «Tomato yellow leaf curl disease-PB» (ООО «НПФ Синтол», Россия) позволяет одновременно выявлять в одной реакционной смеси изоляты TYLCV и TYLCSV. Однако на высоких пороговых циклах (Cq выше 35) наблюдался ложноположительный сигнал с изолятами ToLCNDV, ACMV и BGMV по каналу FAM и с изолятами TYLCV, ToLCNDV и BGMV по каналу ROX (табл. 4, рис. 4).

ВЫВОДЫ

В серии проведенных экспериментов установлена различная специфичность универсальных праймеров Begomo-F3/Begomo-R3 (Naganur et al., 2019), GemCP-V-5'/GemCP-C-3' (Lecoq, Desbiez, 2012), AV-494/AC-1048 (Wyatt, Brown, 1996) и TY1-6F/TY1-3F/TY-2R (Saison, Gentit, 2015) по отношению к различным представителям

The next stage of our work was the development of multiplex tests for the simultaneous detection of several begomoviruses in one reaction mixture. Duplex PCR studies for the simultaneous detection of TYLCV and TYLCSV showed that primers TY-209F/TY-575R and TY-613F/TY-1363R are highly specific for TYLCSV and TYLCV, respectively (Pellegrin et al., 2008). In experiments with the “Qiagen Multiplex PCR Kit” (Qiagen, USA), high-quality specific amplification products were obtained for both target viruses both in their mono-infection and in mixed infection in various combinations. When conducting this test with the “2.5x Mas²MIX-2025” reagent kit (Dialat Ltd., Russia), the results did not differ from those when using the “Qiagen Multiplex PCR Kit” (Qiagen, USA), which indicates a high reproducibility of this test (Fig. 2).

Primers TYLCV-P1F/TYLCV-P1R and TYLCSV-P3F/TYLCSV-P3R were developed by the authors for the specific detection of tomato yellow leaf curl virus and tomato yellow leaf curl Sardinia virus. Previous experiments with them have shown the high efficiency of these primers, but they have not been tested using duplex PCR technology before.

When performing a test with primers TYLCV-P1F/TYLCV-P1R + TYLCSV-P3F/TYLCSV-P3R (RMDVB VNIKR), it was found that these primers allow for the effective diagnosis of TYLCV and TYLCSV isolates both in their mono-infection and in mixtures in various combinations. However, the positive signal for the TYLCV PV-0844 isolate was weak (Fig. 3). To obtain better amplification products and increase sensitivity, this test needs further development.

During the experiment, the reagent kit for RT-PCR to TYLCV and TYLCSV “Tomato yellow leaf curl disease-RT” was tested (Syntol, Russia).

The manufacturer’s specification states that the “Tomato yellow leaf curl disease-RT” reagent kit allows simultaneous detection in one reaction mixture of

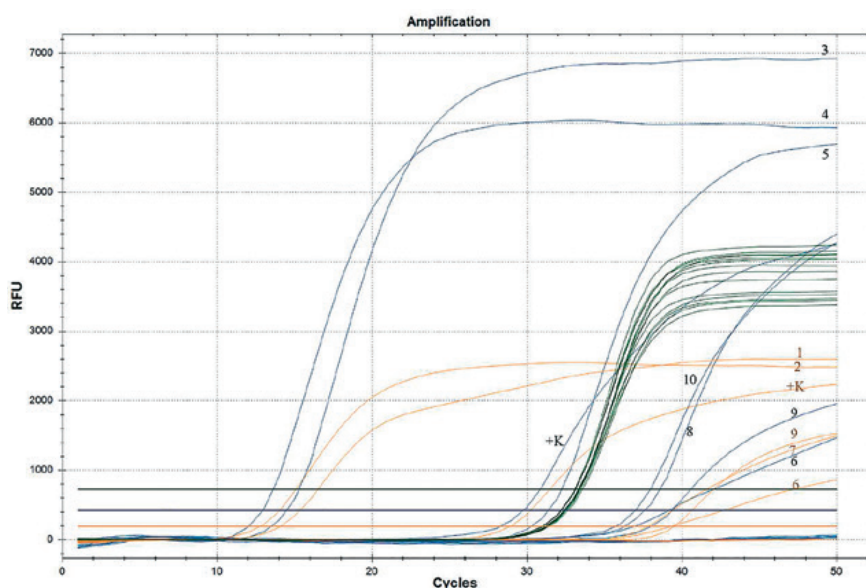


Рис. 4. Кривые амплификации для набора реагентов «Tomato yellow leaf curl disease-PB» (ООО «НПФ Синтол», Россия). RFU – интенсивность флуоресценции.

Fig. 4. Amplification curves for the reagent kit “Tomato yellow leaf curl disease-RT” (Syntol, Russia). RFU – fluorescence intensity.

Таблица 4

Результаты амплификации с набором реагентов «Tomato yellow leaf curl disease-PB» с изолятами некоторых бегомовирусов

Table 4

Amplification results with the “Tomato yellow leaf curl disease-RT” reagent kit with some begomoviruses isolates

№ п/п	Изоляты Isolates	Пороговый цикл (Cq) Threshold cycle (Cq)		
		FAM (TYLCV)	ROX (TYLCSV)	HEX (внутренний контроль) (internal control)
1	TYLCSV PV-0561	N/A	14,11	33,34
2	TYLCSV PC-0596	N/A	12,78	33,57
3	TYLCV PC-0560	14,46	N/A	33,30
4	TYLCV PC-0588	12,93	N/A	33,13
5	TYLCV PV-0844	31,37	39,35	33,48
6	ToLCNDV PC-1109	39,17	37,83	33,38
7	ToLCNDV PC-1111	N/A	N/A	33,33
8	ACMV PC-0873	37,58	N/A	33,38
9	BGMV PC-0094	39,36	39,48	33,08
10	BGMV PV-0462	37,01	N/A	33,34
11	WmCSV PC-0830	N/A	N/A	33,13
12	Отрицательный контроль Negative control	N/A	N/A	33,40
13	Положительный контроль Positive control	29,75	28,95	33,37

N/A – вирус не обнаружен.

N/A – virus not detected.

рода *Begomovirus*. Установлено, что наиболее высокой универсальностью характеризуются праймеры TY1-6F/TY1-3F/TY-2R (Saison, Gentit, 2015), которые реагируют со всеми вышеперечисленными бегомовирусами и могут быть рекомендованы для проведения скрининговых тестов на наличие комплекса бегомовирусов с последующим секвенированием продуктов амплификации.

Проведены испытания дуплексного теста на наличие TYLCV и TYLCSV с праймерами TY-209F/TY-575R + TY-613F/TY-1363R (Pellegrin et al., 2008) и TYLCV-P1F/TYLCV-P1R + TYLCSV-P3F/TYLCSV-P3R (НМОВБ ВНИИКР). Обе комбинации праймеров показали свою перспективность. Работа с этими праймерами будет продолжена.

Установлено, что набор реагентов «Tomato yellow leaf curl disease-PB» (ООО «НПФ Синтол», Россия) позволяет одновременно выявлять в одной реакционной смеси изоляты TYLCV и TYLCSV. Однако на высоких пороговых циклах (Cq выше 35) может наблюдаться ложноположительный сигнал с изолятами других нецелевых бегомовирусов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Accotto G., Navas-Castillo J., Noris E., Moriones E., Louro D., 2000. Typing of Tomato yellow leaf

a gene fragment specific for Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) (via the FAM/Green fluorescence channel) and specific for Tomato yellow leaf curl Axarquia virus (TYLCAX), Tomato yellow leaf curl Malaga virus (TYLCMA), Tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV) gene fragment (via the ROX/Orange fluorescence channel), as well as internal positive control (via the R6G/HEX fluorescence channel).

The test performed confirmed that the “Tomato yellow leaf curl disease-RT” reagent kit (Syntol, Russia) allows simultaneous detection of TYLCV and TYLCSV isolates in one reaction mixture. However, at high threshold cycles (Cq above 35), a false positive signal was observed with ToLCNDV, ACMV, and BGMV isolates via the FAM channel and with TYLCV, ToLCNDV, and BGMV isolates via the ROX channel (Table 4, Fig. 4).

CONCLUSION

In a series of experiments, different specificities of the universal primers Begomo-F3/Begomo-R3 (Naganur et al., 2019), GemCP-V-5'/GemCP-C-3' (Lecoq, Desbiez, 2012), AV-494/AC-1048 (Wyatt, Brown, 1996) and TY1-6F/TY1-3F/TY-2R (Saison, Gentit, 2015) in relation to various members of the *Begomovirus* genus

was established. It has been stated that primers TY1-6F/TY1-3F/TY-2R (Saison, Gentit, 2015), which react with all of the above begomoviruses and can be recommended for screening tests for the presence of the begomovirus complex with subsequent sequencing of amplification products, are characterized by the highest versatility.

A duplex test for the presence of TYLCV and TYLCSV was tested with primers TY-209F/TY-575R + TY-613F/TY-1363R (Pellegrin et al., 2008) and TYLCV-P1F/TYLCV-P1R + TYLCSV-P3F/TYLCSV-P3R (RMDVB VNIKR). Both primer combinations showed their promise. Work with these primers will continue.

It was found that the “Tomato yellow leaf curl disease-RT” reagent kit (Syntol, Russia) allows simultaneous detection of TYLCV and TYLCSV isolates in one reaction mixture. However, at high threshold cycles (Cq above 35) a false positive signal may be observed with isolates of other non-target begomoviruses.

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

REFERENCES

1. Accotto G., Navas-Castillo J., Noris E., Moriones E., Louro D. Typing of Tomato yellow leaf curl

curl viruses in Europe. – *European Journal of Plant Pathology*, Vol. 106: 179–186.

2. Brown J.K., 2010. Phylogenetic biology of the *Bemisia tabaci* sibling species group. – In: *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*. Springer, Netherlands: 31–67.

3. Brown J., Zerbini F., Navas-Castillo J., Moriones E., Ramos-Sobrinho R., Silva J.C.F., Fiallo-Olivé E., Briddon R.W., Hernández-Zepeda C., Idris A., Malathi V.G., Martin D.P., Rivera-Bustamante R., Ueda S., Varsani A., 2015. Revision of *Begomovirus* taxonomy based on pairwise sequence comparisons. – *Archives of Virology*, Vol. 160: 1593–1619.

4. Lecoq H., Desbiez C., 2012. Viruses of cucurbit crops in the Mediterranean region: an ever-changing picture. – *Adv. Virus Res.*, Vol. 84: 67–126.

5. Li R., Salih S., Hurtt S., 2004. Detection of geminiviruses in sweetpotato by polymerase chain reaction. – *Plant Disease*, Vol. 88: 1347–1351.

6. Naganur P., Premchand U., Shankarappa K.S., Mesta R.K., Manjunatha C., Patil C.V., 2019. Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification assay for detection of Tomato leaf curl New Delhi virus in ridge gourd [*Luffa acutangula* (L.) Roxb.]. – *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 8 (9): 2282–2295.

7. Pellegrin F., Mnari-Hattab M., Tahiri A., Dalleau-Clouet C., Peterschmitt M., Bonato O., 2008. First report of simultaneous presence of Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato yellow leaf curl Israel virus infecting crops and weeds in Tunisia. – *Journal of Plant Pathology*, Vol. 90: 145.

8. Saison A., Gentit P. Development of a polyvalent detection method for Begomoviruses presenting a threat to the European tomato industry. – TESTA – EPPO Conference on diagnostics for plant pests 30 to 02/12/2015.

9. Wyatt S., Brown J., 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. – *Phytopathology*, Vol. 86: 1288–1293.

10. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) [Электронный ресурс]. – URL: <https://gd.eppo.int> (дата обращения: 15.11.2022).

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.

viruses in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 2000; Vol. 106: 179–186.

2. Brown J.K. Phylogenetic biology of the *Bemisia tabaci* sibling species group. In: *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*. Springer, Netherlands, 2010; 31–67.

3. Brown J., Zerbini F., Navas-Castillo J., Moriones E., Ramos-Sobrinho R., Silva J.C.F., Fiallo-Olivé E., Briddon R.W., Hernández-Zepeda C., Idris A., Malathi V.G., Martin D.P., Rivera-Bustamante R., Ueda S., Varsani A. Revision of *Begomovirus* taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of Virology*, 2015; Vol. 160: 1593–1619.

4. Lecoq H., Desbiez C. Viruses of cucurbit crops in the Mediterranean region: an ever-changing picture. *Adv. Virus Res.*, 2012; Vol. 84: 67–126.

5. Li R., Salih S., Hurtt S. Detection of geminiviruses in sweetpotato by polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 2004; Vol. 88: 1347–1351.

6. Naganur P., Premchand U., Shankarappa K.S., Mesta R.K., Manjunatha C., Patil C.V. Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification assay for detection of Tomato leaf curl New Delhi virus in ridge gourd [*Luffa acutangula* (L.) Roxb.]. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 2019; 8 (9): 2282–2295.

7. Pellegrin F., Mnari-Hattab M., Tahiri A., Dalleau-Clouet C., Peterschmitt M., Bonato O. First report of simultaneous presence of Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato yellow leaf curl Israel virus infecting crops and weeds in Tunisia. *Journal of Plant Pathology*, 2008; Vol. 90: 145.

8. Saison A., Gentit P. Development of a polyvalent detection method for Begomoviruses presenting a threat to the European tomato industry. – TESTA – EPPO Conference on diagnostics for plant pests 30 to 02/12/2015.

9. Wyatt S., Brown J. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 1996; Vol. 86: 1288–1293.

10. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) [Electronic resource]. URL: <https://gd.eppo.int> (last accessed: 15.11.2022).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Evgenia Lozovaya, Researcher, Postgraduate 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.

Tatyana 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.