

DOI 10.69536/3725.2024.54.83.003
УДК 632.3.01/.08

Диагностика вируса мозаики пепино (PepMV)

*ЖИВАЕВА Т.С.¹, ПРУЧКИНА М.А.²,
ПРИХОДЬКО Ю.Н.³, ШНЕЙДЕР Ю.А.⁴,
КАРИМОВА Е.В.⁵

¹ e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru

² e-mail: anadiamena@gmail.com

³ e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru

⁴ ORCID ID: 0000-0002-7565-1241,

e-mail: yury.shneyder@mail.ru

⁵ ORCID ID: 0000-0001-6474-8913,

e-mail: elenavkar@mail.ru

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»
(ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. о. Раменский,
Московская обл., Россия, 140150

АННОТАЦИЯ

Вирус мозаики пепино (Pepino mosaic virus, PepMV) – представитель рода Potexvirus, является карантинным объектом для стран ЕАЭС, ЕОКЗР и ряда стран различных континентов. Основные растения-хозяева вируса – томат и баклажан, но также он поражает перец, картофель и пепино. Потери урожая плодов томата в результате заражения PepMV могут достигать 30-40%. Вирус мозаики пепино характеризуется многообразием путей распространения и способен длительное время сохраняться в растительных остатках, почве, воде, растворах для гидропонии и на различных инертных поверхностях. Важное значение в распространении PepMV имеет семенная инфекция. С зараженными семенами вирус способен распространяться на новые территории, а единичные зараженные семена в партии способны в процессе вегетации нанести колоссальный ущерб производителю овощных культур.

Мировая популяция вируса мозаики пепино состоит из пяти генетически различающихся штаммов, что затрудняет его диагностику с использованием молекулярных методов. Целью проводимых исследований являлся поиск праймеров, позволяющих осуществлять универсальное выявление изолятов всех штаммов вируса мозаики пепино и праймеров, позволяющих проводить высокоспецифичное определение штаммовой принадлежности выявляемых изолятов этого вируса. По результатам испытания 13 пар праймеров определены три пары праймеров для универсального выявления всех штаммов PepMV и две пары праймеров для высокоспецифичного определения штаммов Eu/Peruvian. Констатируется необходимость дальнейшего скрининга праймеров для высокоспецифичного определения штаммов CH1/US1 и CH2 PepMV.

Ключевые слова. молекулярная диагностика, обратная транскрипция, полимеразная цепная реакция, праймеры.

DOI 10.69536/3725.2024.54.83.003
УДК 632.3.01/.08

Diagnostics of Pepino mosaic virus (PepMV)

*TATIANA S. ZHIVAeva¹, MARIA A. PRUCHKINA²,
YURI N. PRIKHODKO³, YURI A. SHNEYDER⁴,
ELENA V. KARIMOVA⁵

¹ e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru

² e-mail: anadiamena@gmail.com

³ e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru

⁴ ORCID ID: 0000-0002-7565-1241,

e-mail: yury.shneyder@mail.ru

⁵ ORCID ID: 0000-0001-6474-8913,

e-mail: elenavkar@mail.ru

FGBU “All-Russian Plant Quarantine Center”
(FGBU “VNIKCR”), Bykovo, Ramenskoye,
Moscow Oblast, Russia, 140150

ABSTRACT

Pepino mosaic virus (PepMV), a representative of the genus Potexvirus, is a quarantine pest for the EAEU and the EPPO countries, as well as some other countries on different continents. The main host plants of the virus are tomato and eggplant, though it also affects peppers, potatoes and pepino. Tomato fruit yield losses as a result of PepMV infection can reach 30-40%. PepMV is characterized by various pathways and can maintain in plant debris, soil, water, hydroponic solutions and on various inert surfaces for a long time. Seed infection plays an important role in the spread of PepMV. With infected seeds, the virus can spread to new territories, and single infected seeds in a batch can cause colossal damage to vegetable producers during the growing season.

The global PepMV population consists of five genetically distinct strains, making it difficult to diagnose using molecular methods. The purpose of the research was to search for primers that allow universal detection of isolates of all PepMV strains and primers that allow highly specific determination of the strain affiliation of the detected isolates of this virus. Based on the results of testing 13 pairs of primers, three pairs of primers were identified for the universal detection of all PepMV strains and two pairs of primers for the highly specific detection of Eu/Peruvian strains. The need for further screening of primers for highly specific determination of CH1/US1 and CH2 PepMV strains has been stated.

Key words: molecular diagnostics, reverse transcription, polymerase chain reaction, primers.

ВВЕДЕНИЕ



Вирус мозаики пегино (Pepino mosaic virus, PepMV), относящийся к роду Potexvirus семейства Alphaflexiviridae, является карантинным объектом ЕАЭС, ЕОКЗР и целого ряда стран мира.

Основными экономически значимыми растениями-хозяевами вируса мозаики пегино являются: томат (*Solanum lycopersicum*), картофель (*S. tuberosum*), пегино (*S. muricatum*), баклажан (*S. melongena*), базилик (*Ocimum basilicum*). К настоящему времени также доказано, что штамм PepMV US1 может вызывать системное заражение перца (*Capsicum annuum*), тогда как другие штаммы вызывают на этом растении лишь местную инфекцию. Вирус заражает также различные дикорастущие растения, относящиеся как к семейству пасленовые (*Datura stramonium*, *D. metel*, *Solanum chilense*, *S. chmielewskii*, *S. dulcamara*, *S. nigrum*, *S. parviflorum*, *S. peruvianum* и другие), так и к другим ботаническим семействам (*Amaranthus retroflexus*, *Amaranthus viridis*, *Calendula arvensis*, *Convolvulus arvensis*, *Convolvulus humilis*, *Heliotropium europaeum*, *Malva neglecta*, *Malva parviflora*, *Plantago major*, *Rumex sp.*, *Sonchus oleraceus*, *Taraxacum officinale* и другие) (EPPO, 2024).

Вирионы PepMV представляют собой гибкие нитевидные частицы величиной 510 x 12.5 нм (Jones et al., 1980).

Геном PepMV состоит из единственной плюс-смысловой одноцепочечной молекулы РНК с 3'-поли-А-концом, состоящей из 6410 нуклеотидов (не включая поли-А-тракта). Геномная РНК содержит пять открытых рамок считывания (ORF), кодирующих РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp) размером 164 кДа, тройной блок генов размером 26, 14 и 9 кДа и ген белка оболочки (CP) размером 25 кД (Mumford, Jones, 2005; Ling et al., 2013).

На основании особенностей биологии, серологии и сравнения нуклеотидных последовательностей в настоящее время выделяют четыре основных штамма PepMV, заражающих коммерческие сорта томата – европейский (EU), перуанский (LP), чилийский-2 (CH2) и американский-1 (US1), а также штамм PES, идентифицированный на диких видах растений семейства пасленовых в Перу.

Сравнение нуклеотидных последовательностей полного генома между множественными изолятами разных штаммов показывает, что перуанский и европейский штаммы (LP и EU) наиболее тесно связаны между собой с примерно 95% идентичностью последовательностей. Штамм американский-1 (US1) и новый штамм PES примерно на 86% идентичны друг другу и примерно на 81% идентичны перуанскому (LP) и европейскому (EU) штаммам. Штамм чилийский-2 (CH2) является наиболее дивергентным, поскольку имеет примерно 78% идентичности последовательностей с четырьмя другими штаммами. При этом идентичность последовательностей нуклеотидов между изолятами внутри каждого штамма составляет не менее 98% (EPPO, 2024).

Наличие существенных генетических различий между изолятами PepMV обуславливает необходимость детальной обработки молекулярных методов диагностики.

INTRODUCTION



epino mosaic virus (PepMV), belonging to the genus Potexvirus of the family Alphaflexiviridae, is a quarantine pest for the EAEU and the EPPO countries, as well as some other countries.

The main economically important PepMV host plant are: tomato (*Solanum lycopersicum*), potato (*S. tuberosum*), pepino (*S. muricatum*), eggplant (*S. melongena*), basil (*Ocimum basilicum*). It has now also been proven that the PepMV US1 strain can cause systemic infection of peppers (*Capsicum annuum*), while other strains cause only a local infection on this plant. The virus also infects various wild plants belonging to the Solanaceae family (*Datura stramonium*, *D. metel*, *Solanum chilense*, *S. chmielewskii*, *S. dulcamara*, *S. nigrum*, *S. parviflorum*, *S. peruvianum*, etc.), as well as to other botanical families (*Amaranthus retroflexus*, *Amaranthus viridis*, *Calendula arvensis*, *Convolvulus arvensis*, *Convolvulus humilis*, *Heliotropium europaeum*, *Malva neglecta*, *Malva parviflora*, *Plantago major*, *Rumex sp.*, *Sonchus oleraceus*, *Taraxacum officinale*, etc.) (EPPO, 2024).

PepMV virions are flexible filamentous particles measuring 510 x 12.5 nm (Jones et al., 1980).

The PepMV genome consists of one single stranded positive sense RNA molecule with a 3' poly-A end, consisting of 6410 nucleotides (not including the poly-A tract). Genomic RNA contains five open reading frames (ORFs) encoding the 164-kDa RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), a 26-, 14-, and 9-kDa triple block of genes, and a 25-kDa coat protein (CP) gene (Mumford, Jones, 2005; Ling et al., 2013).

Based on the biology, serology and comparison of nucleotide sequences, four main PepMV strains are currently identified that infect commercial tomato varieties – European (EU), Peruvian (LP), Chilean-2 (CH2) and American-1 (US1), as well as PES strain identified on wild Solanaceae species in Peru.

Comparison of whole genome nucleotide sequences between multiple isolates of different strains shows that the Peruvian and European strains (LP and EU) are most closely related, with approximately 95% sequence identity. The American strain 1 (US1) and the new PES strain are approximately 86% identical to each other and approximately 81% identical to the Peruvian (LP) and European (EU) strains. Strain Chilean-2 (CH2) is the most divergent, sharing approximately 78% sequence identity with four other strains. Moreover, the identity of nucleotide sequences between isolates within each strain is at least 98% (EPPO, 2024).

The presence of significant genetic differences between PepMV isolates requires detailed development of molecular diagnostic methods.

PepMV is a highly contagious pathogen and is effectively transmitted by mechanical sap inoculation and by contact between healthy and infected plants. As a result, the virus easily spreads mechanically through contaminated tools, shoes, clothing, and hands during agricultural work (Mehle et al., 2014). It was also experimentally established that the virus is effectively

Вirus мозаики пегино является очень кон- тагиозным патогеном и эффективно переносится механической инокуляцией сока и путем контак- та между здоровыми и зараженными растениями. Вследствие этого вирус легко распространяется механическим путем через загрязненные инстру- менты, обувь, одежду, руки в процессе проведения агротехнических работ (Mehle et al., 2014). Экспе- риментально было установлено также, что вирус эффективно передается между растениями тома- та в закрытых рециркуляционных гидропонных системах (Shipp et al., 2008).

Вirus может длительное время сохранять ин- фекционность вне своих растений-хозяев в окру- жающей среде. Установлено, что в воде при темпе- ратуре $20\pm 4^{\circ}\text{C}$ PepMV сохраняет инфекционность на протяжении трех недель (Mehle et al., 2014). В соке инфицированных растений томата, нане- сенном на различные неорганические поверхно- сти (стекло, алюминий, пластик), вирус сохраняет инфекционность на протяжении 5 недель при ус- ловии наличия относительно невысокой темпе- ратуры и высокой влажности воздуха (Mumford, Jones, 2005).

Важную роль в эпидемиологии PepMV име- ет семенная инфекция. Установлено, что зара- женность этим вирусом семян томата составля- ет в среднем 0,026%, но может варьироваться от 0,005% до 0,057% в зависимости от партии се- мян (Hanssen et al., 2010). Сообщалось также о вы- явлении PepMV в 25% семян томата, что приво- дило к заражению 1,84% растений, полученных от этих семян (Cordoba-Selles et al., 2010). Однако вследствие эффективной механической передачи наличие даже немногочисленных зараженных се- мян приводит к очень быстрому распространению этого вируса в посадках томата.

Установлена возможность переноса PepMV шмелями с зараженных растений томата на здо- ровые экземпляры (Lacasa et al., 2003; Shipp et al., 2008), а также с зараженных растений томата на несколько видов сорных растений (Stobbs et al., 2010).

Важное значение имеет также вопрос о воз- можности распространения PepMV хищным кло- пом макролофусом (*Macrolophus nubilis* H.S.), широко используемым в качестве агента биоло- гической борьбы. Для этого клопа характерен зо- офитофаговый тип питания, то есть способность питаться пищей как животного, так и раститель- ного происхождения. В этой связи в Нидерлан- дах было установлено, что при наличии высокой численности популяций *Macrolophus nubilis* начи- нает питаться на плодах томата, вызывая их по- вреждения, и интенсивность этих повреждений коррелировала с заражением PepMV (Moerkens et al., 2015).

Таким образом, вирус мозаики пегино харак- теризуется многообразием путей распростране- ния и мест локализации инфекции (Шнейдер Ю.А. и др., 2021). Для выявления очагов этого вируса, помимо лабораторного исследования вегетиру- ющих растений, семян и плодов растений тома- та, необходимо также определять отсутствие вируса в поливной воде, растворах для гидропо- ники, субстратах для выращивания растений,

transmitted between tomato plants in closed recircu- lating hydroponic systems (Shipp et al., 2008).

The virus can remain infective for long periods of time outside its host plants in the environment. It was found that PepMV remains infective for three weeks in water at a temperature of $20\pm 4^{\circ}\text{C}$ (Mehle et al., 2014). The virus remains infective for 5 weeks in the sap of in- fected tomato plants applied to various inorganic sur- faces (glass, aluminum, plastic), provided there is a rel- atively low temperature and high humidity (Mumford, Jones, 2005).

Seed infection plays an important role in the Pep- MV epidemiology. The infection rate of this virus in to- mato seeds has been found to average 0.026%, but can vary from 0.005% to 0.057% depending on the seed lot (Hanssen et al., 2010). PepMV was also reported to be detected in 25% of tomato seeds, resulting in infection of 1.84% of plants obtained from these seeds (Cordo- ba-Selles et al., 2010). However, due to effective me- chanical transmission, the presence of even a few in- fected seeds leads to a very rapid spread of this virus in tomato plantings.

The possibility of PepMV transfer by bumblebees from infected tomato plants to healthy specimens has been established (Lacasa et al., 2003; Shipp et al., 2008), as well as from infected tomato plants to several weed species (Stobbs et al., 2010). Transfer of PepMV by bumblebees occurs in a non-persistent mechani- cal manner.

Also important is the question of the possible Pep- MV spreading by the predatory bug *Macrolophus nubilis* H.S., which is widely used as a biological control agent. This bug is characterized by a zoophytophagous type of nutrition, i.e. the ability to feed on both animal and plant origin food. In this regard, it was found that when there are high *Macrolophus nubilis* populations in the Netherlands, it begins to feed on tomato fruits, causing



Рис. 1. Симптомы вируса мозаики пегино (PepMV) на листьях томата (фото авторов)

Fig. 1. Symptoms of pepino mosaic virus (PepMV) on tomato leaves (photo by the authors)



Рис. 2. Симптомы вируса мозаики пепино (PepMV) на растении томата (фото авторов)

Fig. 2. Symptoms of pepino mosaic virus (PepMV) on tomato leaves (photo by the authors)

на конструкциях теплиц, таре и оборудовании, а также в насекомых-опылителях и объектах биологической борьбы.

Интенсивность проявления симптомов ПерMV на растениях томата варьируется от незначительных до серьезных в зависимости от агрессивности штамма ПерMV, возраста и сорта томата, а также условий выращивания. Первые симптомы обычно появляются через 2–3 недели после заражения. Ранние симптомы проявляются на верхних частях пораженных растений в виде образования светло-зеленых тонких или игольчатых листьев и задержки роста. Затем на листьях развиваются мозаика, желтая угловатая пятнистость, слабый межжилковый хлороз и деформации (Рис. 1–2). На побегах и цветках могут развиваться некрозы, оказывающие влияние на развитие цветов и плодов. Сильно пораженные растения становятся чахлыми и деформированными (EPPO, 2024).



Рис. 3. Симптомы вируса мозаики пепино (PepMV) на плодах томата (фото авторов)

Fig. 3. Symptoms of pepino mosaic virus (PepMV) on tomato leaves (photo by the authors)



Photo Shneyder Y.

Рис. 4. Симптомы совместного заражения вирусом мозаики пепино (PepMV) и вирусом пятнистого увядания томата (TSWV) на плодах томата (фото авторов)

Fig. 4. Symptoms of co-infection of PepMV and TSWV on tomato fruits (photo by the authors)

damage, with the intensity of this damage correlating with PepMV infection (Moerkens et al., 2015).

Thus, PepMV is characterized by a variety of pathways and infection localization (Schneider Y.A. et al., 2021). To identify its outbreaks, besides laboratory testing of vegetative plants, seeds and fruits of tomato plants, it is also necessary to determine the absence of the virus in irrigation water, hydroponic solutions, substrates for growing plants, on greenhouse structures, containers and equipment, as well as in insect pollinators and biological control objects.

The severity of PepMV symptoms on tomato plants varies from mild to severe depending on the severity of the PepMV strain, the age and variety of the tomato, and growing conditions. The first symptoms usually appear 2–3 weeks after infection. Early symptoms appear on the upper parts of affected plants with the formation of light green, thin or needle-like leaves and stunted growth. Then the leaves develop mosaic, yellow angular spots, mild interveinal chlorosis and deformations (Fig. 1–2). Necrosis may develop on shoots and flowers, affecting the development of flowers and fruits. Severely affected plants become stunted and of irregular shape (EPPO, 2024).

Tomato fruits typically develop yellow-red mosaic patterns (marbling) as a result of PepMV infection (Fig. 3), resulting in uneven fruit ripening. Fruit cracking, deformation and necrotization are sometimes observed (EPPO, 2024). Co-infection of plants with PepMV and TSWV increases the intensity of symptoms (Fig. 4).

MATERIALS AND METHODS

In experiments to test the diagnosis of PepMV, isolates of this virus were used PV-0554, PV-0577, PV-0578, PV-0632, PV-0674, PV-0716, PV-0730, PV-0750, PV-0751, PV-0973, PV-0975, PV-1022, PV-1110 and PV-1125 (all – DSMZ, Germany), positive controls for PepMV ELISA from Adgen (UK), Bioreba (Switzerland) and Loewe (Germany), as well as potexvirus isolates: potato X (PVX PV-0014, PV-0020, PV-0847), Clover yellow mosaic virus (CIYMV PV-0851), Cymbidium mosaic virus (CymMV, PV-0334), Hydrangea ringspot virus (HRSV, PV-0372), Potato aucuba mosaic virus (PAMV, PV-0007) and Alternanthera mosaic virus (AltMV, PV-0849) (all – DSMZ, Germany).

RNA isolation of the studied viruses was carried out with a set of Proba-NK reagents (Agrodiagnostica, Russia), according to the manufacturer's instructions.

Synthesis of complementary DNA was carried out using reagent kits for reverse transcription from Agrodiagnostica and Evrogen (both from Russia), according to the attached instructions.

PCR testing to detect PepMV was carried out with the primers presented in Table 1.

На плодах томата в результате заражения Пер-МВ, как правило, развиваются желто-красные мозаичные узоры (мраморность) (Рис. 3), что приводит к неравномерному созреванию плодов. Иногда наблюдается растрескивание плодов, их деформация и некротизация (ЕРРО, 2024). Совместное заражение растений вирусами мозаики пегино (ПерМВ) и пятнистого увядания томата (TSWV) усиливает интенсивность проявления симптомов (Рис. 4).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах по отработке диагностики вируса мозаики пегино (ПерМВ) использовали изоляты этого вируса PV-0554, PV-0577, PV-0578, PV-0632, PV-0674, PV-0716, PV-0730, PV-0750, PV-0751,

The following reagent kits were used to carry out PCR:

Dream TaqGreen PCR Master Mix (Thermo-Scientific, USA); 5x Mas^{DP}Mix-2025; 2,5x Mas^{CPE}TaqMIX-2025 (both – Dialat, Russia); Screen Mix; Screen Mix-HS; One Tube RT-PCR SYBR, qPCRMix-HS, qPCRMix-HS SYBR + High ROX (all – Evrogen, Russia).

RESULTS AND DISCUSSION

The purpose of the research was to search for primers that allow universal detection of isolates of all PepMV strains, and primers that allow highly specific determination of the strain affiliation of detected isolates of this virus.

Табл. 1. Характеристика праймеров, используемых для проведения ПЦР на наличие вирусов

Table 1. Characteristics of primers used for PCR for viruses

Название праймера Primer name	Последовательность 5'→3' Sequence 5'→3'	Продукт (п.н.) Product (bp)	Автор Author
PepMVCH2CPF	GT'TTTCCTCAATTGTGAAAT	855	Ling et al., 2013
PepMVCH2CPR	TT'TTTT'TTTTATTTAGTAGATTTAGATAC		
PepMVEUCPF	GT'TTTCCTAAATTGAAAAAT	839	Ling et al., 2013
PepMVEUCPR	ATTTCAAAGAAATAATTAGG		
PepMVUS1CPF	GT'TTTCCTAGTGT'TTGAAA	846	Ling et al., 2013
PepMVUS1CPR	AAATTACAAAAGCAATTTAT'TG		
PepTGB-F	CAC ACC AGA AGT GCT TAA AGC A	845	Mumford, Metcalfe, 2001
PepUTR-R	CTC TGA TTA AGT TTC GAC TG		
Pep3	ATGAGGTTGTCTGGTGAA	624	Souiri et al., 2017
Pep4	AATCCGTGCACAACTAT		
PepCP-D	CAC ACC AGA AGT GCT TAA AGC A	845	Pagan et al., 2006
PepCP-R	CTC TGA TTA AGT TTC GAG TG		
pepF2	AAACAATTTAACTCAACTATG	750	Candresse et al., 2010
pepR	TGATTAAGTTTCGAGTGTTTA		
PepMV CP-7F	CCCATCAGATGCACCACCAA	680	Разработаны в рамках данного исследования Developed as part of this study
PepMV CP-2R	CAGGAGGTGCATCAATTGCG		
Eur-rep F	TGGGTCAAGAAAGTGGAATAATTAG	71	Gutierrez-Aguirre et al., 2009
Eur-rep R	TGCATGAAAGCTGCAATGGT		
Eur-rep P	FAM-TGCTGTCAAGTCAAAGCCTGGCCA -BHQ1		
Ch2-US2-cp F	TGGGT'TTAGCAGCCAATGAGA	72	Gutierrez-Aguirre et al., 2009
Ch2-US2-cp R	AACTTTGCACATCAGCATAAGCA		
Ch2-US2-cp P	FAM-CGGACCTGCCATGTGGGACCTC-BHQ1		
US1-cp F	AGCGCGTGCTTATGCTGAT	81	Gutierrez-Aguirre et al., 2009
US1-cp R	CGTGAGAGTGCTGGATTTGAAG		
US1-cp P	FAM-CCGCACAACCTCATAGGTGCCACCC - BHQ1		
KL05-48 F1	ACTCCTAGAGCTGACCTCAC	107	Ling et al., 2007; EPPO, 2013
KL05-49 F2	ACTCCTAGAGCTGATCTTAC		
KL05-51 R1	TCTCCAGCAACAGGTTGGTA		
KL05-52 R2	TCACCTGCAACTGGTTGATA		
KL05-50 probe	FAM-TGTCAGCTTGCATTTACTTCC AAA - BHQ1		

PV-0973, PV-0975, PV-1022, PV-1110 и PV-1125 (все – DSMZ, Германия), положительные контроли для ИФА к PepMV фирм Adgen (Великобритания), Bioreba (Швейцария) и Loewe (Германия), а также изоляты потексвирусов: X картофеля (PVX PV-0014, PV-0020, PV-0847), желтой мозаики клевера (CIYMV PV-0851), мозаики цимбидиума (CymMV, PV-0334), кольцевой пятнистости гортензии (HRSV, PV-0372), аукуба мозаики картофеля (PAMV, PV-0007) и мозаики альтернаты (AltMV, PV-0849) (все – DSMZ, Германия).

Выделение РНК изучаемых вирусов проводили с набором реагентов Проба-НК (Агродиагностика, Россия), согласно инструкции фирмы-производителя.

Синтез комплементарной ДНК проводили с наборами реагентов для обратной транскрипции фирм Агродиагностика и Евроген (обе – Россия), согласно прилагаемым инструкциям.

Отработку ПЦР для выявления вируса мозаики пепино (PepMV) проводили с праймерами, представленными в таблице 1.

Для проведения ПЦР использовали следующие наборы реагентов:

Dream TaqGreen PCR Master Mix (Thermo-Scientific, США); 5x Mas^{DP}Mix-2025; 2,5x Mas^{CFE}TaqMIX-2025 (оба – Диалат, Россия); Screen Mix; Screen Mix-HS; One Tube RT-PCR SYBR, qPCRmix-HS, qPCRmix-HS SYBR + High ROX (все – Евроген, Россия).

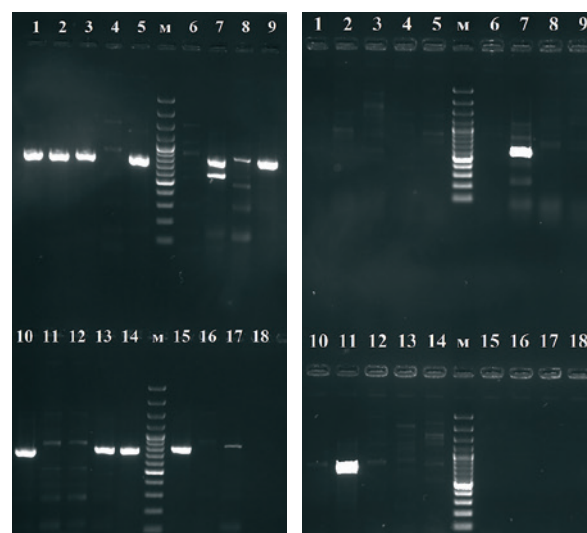
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Целью проводимых исследований являлся поиск праймеров, позволяющих осуществлять универсальное выявление изолятов всех штаммов вируса мозаики пепино, и праймеров, позволяющих проводить высокоспецифичное определение штаммовой принадлежности выявляемых изолятов этого вируса.

На первом этапе работы было проведено определение штаммовой принадлежности 14 изолятов PepMV из коллекции DSMZ и положительных контролей для ИФА к PepMV фирм Adgen, Bioreba и Loewe с использованием праймеров PepMVEUCPF/PepMVEUCPR, PepMVUS1CPF/PepMVUS1CPR и PepMVCH2CPF/PepMVCH2CPR (Ling et al., 2013), разработанных для выявления штаммов EU, US-1 и CH-2, соответственно. Эксперименты проводили с набором реагентов 5x Mas^{CFE}Mix-2025 фирмы Диалат. Для подавляющего большинства этих изолятов штаммовая принадлежность не изучалась (Shneyder et al., 2016).

В эксперименте с праймерами PepMVEUCPF/PepMVEUCPR специфичные продукты планируемой величины были получены для изолятов PepMV PV-0554, PV-0577, PV-0578, PV-0674, PV-0751, PV-0973, PV-1110, PV-1125 и положительных контролей для ИФА к PepMV фирм Bioreba и Loewe (рис.5а). Для изолята PepMV PV-0730 было получено два продукта амплификации, а для изолята PepMV PV-0750 – многочисленные продукты амплификации.

В эксперименте с праймерами PepMVCH1CPF/PepMVCH1CPR продукты амплификации получены для изолятов PepMV PV-0730 и PepMV PV-0975 (рис.5б).



**а) Праймеры
PepMVEUCPF/
PepMVEUCPR**

(специфичный продукт –
839 п.о.)

**а) Primers PepMVEUCPF/
PepMVEUCPR (specific
product – 839 bp)**

**б) Праймеры
PepMVUS1CPF/
PepMVUS1CPR**

(специфичный продукт –
846 п.о.)

**б) Primers PepMVUS1CPF/
PepMVUS1CPR (specific
product – 846 bp)**

***Примечание:** Образцы (изоляты PepMV):

1 – PepMV PV-0554; 2 – PepMV PV-0577;
3 – PepMV PV-0578; 4 – PepMV PV-0632;
5 – PepMV PV-0674; 6 – PepMV PV-0716;
7 – PepMV PV-0730; 8 – PepMV PV-0750;
9 – PepMV PV-0751; 10 – PepMV PV-0973;
11 – PepMV PV-0975; 12 – PepMV PV-1022;
13 – PepMV PV-1110; 14 – PepMV PV-1125;
15 – положительный контроль для ИФА к PepMV фирмы Bioreba; 16 – положительный контроль для ИФА к PepMV фирмы Adgen; 17 – положительный контроль для ИФА к PepMV фирмы Loewe; 18 – отрицательный контроль (вода).

***Note:** Samples (isolates PepMV): 1 – PepMV PV-0554; 2 – PepMV PV-0577; 3 – PepMV PV-0578; 4 – PepMV PV-0632; 5 – PepMV PV-0674; 6 – PepMV PV-0716; 7 – PepMV PV-0730; 8 – PepMV PV-0750; 9 – PepMV PV-0751; 10 – PepMV PV-0973; 11 – PepMV PV-0975; 12 – PepMV PV-1022; 13 – PepMV PV-1110; 14 – PepMV PV-1125; 15 – positive control for PepMV ELISA from Bioreba; 16 – positive control for PepMV ELISA from Adgen; 17 – positive control for PepMV ELISA from Loewe; 18 – negative control (water).

**Рис. 5. Определение
штаммовой принадлежности
референтных изолятов вируса
мозаики пепино (PepMV)
с использованием праймеров
PepMVEUCPF/ PepMVEUCPR
и PepMVUS1CPF/PepMVUS1CPR
(Ling et al., 2013)**

**Fig. 5. Determination of
strain affiliation of reference
PepMV isolates using
the primers PepMVEUCPF/
PepMVEUCPR
and PepMVUS1CPF/
PepMVUS1CPR
(Ling et al., 2013)**

At the first stage of the work, the strain identity of 14 PepMV isolates from the DSMZ collection and positive controls for PepMV ELISA from Adgen, Bioreba and Loewe were determined using primers PepMVEUCPF/PepMVEUCPR, PepMVUS1CPF/PepMVUS1CPR and

В опыте с праймерами PepMVCH2CPF/PepMVCH2CPR для целого ряда изолятов также наблюдалось образование различных продуктов амплификации. Однако большинство этих продуктов были величиной около 800 п.о., тогда как специфичный продукт для этих праймеров должен составлять 549 п.о. Наиболее интенсивный положительный сигнал имел место для изолятов PepMV PV-0632, PV-0716, PV-1022, PV-11125 и положительного контроля для ИФА фирмы Adgen (результаты не показаны).

Результаты проведенных экспериментов позволяют отнести изоляты DSMZ PepMV PV-0554, PV-0577, PV-0578, PV-0674, PV-0751, PV-0973, PV-1110, PV-1125 и положительных контролей для ИФА к PepMV фирм Bioreba и Loewe к штамму EU, а изолят PepMV PV-0975 – к штамму CH1/US1. Для изолята PepMV PV-0730 можно предположить наличие смешанной инфекции штаммов EU и CH1/US1. Не была определена точная штаммовая принадлежность изолятов DSMZ PepMV PV-0632, PV-0716, PV-0750, PV-0975, PV-1022 и положительного контроля для ИФА к PepMV фирмы Adgen. Ввиду отсутствия реакции этих изолятов с праймерами PepMVEUCPF/PepMVEUCPR и PepMVUS1CPF/PepMVUS1CPR и наличия положительного сигнала с праймерами PepMVCH2CPF/PepMVCH2CPR, можно предположить их принадлежность к штамму CH2/US2.

Целью последующих экспериментов являлось определение штаммовой специфичности праймеров PepMV CP-7F/PepMV CP-2R, разработанных в рамках данного исследования, а также праймеров из публикаций PepTGB-F/PepUTR-R (Mumford, Metcalfe, 2001), PepCP-D/PepCP-R (Pagan et al., 2006), pepF2/pepR (Candresse et al., 2010) и Pep3/Pep4 (Souiri et al., 2017). На предварительном этапе работы была установлена принципиальная возможность использования всех пяти испытываемых пар праймеров с наборами реагентов DreamTaq Green PCR Master Mix (ThermoScientific), 5x MasDDTaqMix-2025 (Диалат) и ScreenMix-HS (Евроген) (результаты не показаны). Последующие эксперименты проводили с набором реагентов 5x MasDDTaqMIX-2025 и двумя вариантами синтеза кДНК.

Для проведения тестов со всеми испытываемыми парами праймеров констатируется однозначное преимущество использования кДНК, синтезированной набором реагентов MMLV RT Kit фирмы Евроген по сравнению с набором реагентов для обратной транскрипции фирмы Агродиагностика (результаты не показаны). Для всех испытываемых пар праймеров не наблюдалось неспецифичной реакции с изолятами нецелевых потексвирусов желтой мозаики клевера (CIYMV), мозаики цимбидиума (CymMV), кольцевой пятнистости гортензии (HRSV), мозаики альтернатеры (AltMV), аукуба мозаики картофеля (PAMV) и X картофеля (PVX), что свидетельствует об их высокой специфичности к PepMV. Все праймеры реагировали с вакцинным препаратом V10 (Valto, Нидерланды), который содержит смесь слабопатогенных изолятов PepMV штаммов EU и CH2 (рис. 6).

По результатам проведенных экспериментов установлена возможность использования

PepMVCH2CPF/PepMVCH2CPR (Ling et al., 2013), designed to detect strains EU, US-1 and CH-2, respectively. Experiments were carried out with a set of reagents 5x MasCFEMix-2025 by Dialat. For the vast majority of these isolates, strain affiliation was not studied (Shneyder et al., 2016).

In the experiment with primers PepMVEUCPF/PepMVEUCPR, specific products of the expected size were obtained for PepMV isolates PV-0554, PV-0577, PV-0578, PV-0674, PV-0751, PV-0973, PV-1110, PV-1125 and positive controls for PepMV ELISA from Bioreba and Loewe (Fig. 5a). Two amplification products were obtained for the PepMV PV-0730 isolate, and multiple amplification products were obtained for the PepMV PV-0750 isolate.

In the experiment with primers PepMVCH1CPF/PepMVCH1CPR, amplification products were obtained for isolates PepMV PV-0730 and PepMV PV-0975 (Fig. 5b).

In experiments with primers PepMVCH2CPF/PepMVCH2CPR for some isolates, the formation of various amplification products was also observed. However, most of these products were around 800 bp in size, whereas the specific product for these primers should be 549 bp. The most intense positive signal was observed for PepMV isolates PV-0632, PV-0716, PV-1022, PV-11125 and the positive control for the Adgen ELISA (results not shown).

The results of the experiments allow us to classify the DSMZ PepMV isolates PV-0554, PV-0577, PV-0578, PV-0674, PV-0751, PV-0973, PV-1110, PV-1125 and positive controls for ELISA as PepMV from Bioreba and Loewe to the EU strain, and the PepMV isolate PV-0975 to the CH1/US1 strain. For the PepMV isolate PV-0730, a mixed infection of the EU and CH1/US1 strains can be assumed. The exact strain affiliation of the DSMZ PepMV PV-0632, PV-0716, PV-0750, PV-0975, PV-1022 isolates and the positive control for ELISA to PepMV from Adgen was not determined. Due to the lack of reaction of these isolates with primers PepMVEUCPF/PepMVEUCPR and PepMVUS1CPF/PepMVUS1CPR and the presence of a positive signal with primers PepMVCH2CPF/PepMVCH2CPR, it can be assumed that they belong to the CH2/US2 strain.

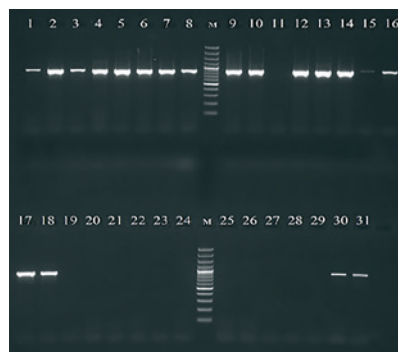
The purpose of subsequent experiments was to determine the strain specificity of the PepMV CP-7F/PepMV CP-2R primers developed as part of this study, as well as primers from the publications PepTGB-F/PepUTR-R (Mumford, Metcalfe, 2001), PepCP-D/PepCP-R (Pagan et al., 2006), pepF2/pepR (Candresse et al., 2010) and Pep3/Pep4 (Souiri et al., 2017). At the preliminary stage of the work, the fundamental possibility of using all five tested primer pairs with the DreamTaq Green PCR Master Mix (ThermoScientific), 5x MasDDTaqMix-2025 (Dialat) and ScreenMix-HS (Evrogen) reagent kits was established (results not shown). Subsequent experiments were carried out with a set of reagents 5x MasDDTaqMIX-2025 and two options for cDNA synthesis.

To carry out tests with all the tested primer pairs, there was a clear advantage of using cDNA synthesized with the MMLV RT Kit reagent kit by Evrogen compared

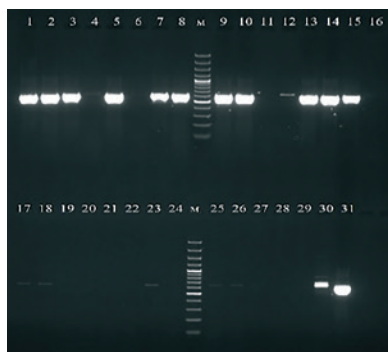
праймеров PepCP-D/PepCP-R (Pagan et al., 2006) для универсального выявления изолятов всех штаммов PepMV. Для праймеров PepTGB-F/PepUTR-R (Mumford, Metcalfe, 2001) характерна реакция со штаммами Peruviav, EU и CH2, но отсутствует реакция со штаммом CH1/US1. Праймеры Pep3/Pep4 (Souiri et al., 2017) реагировали лишь с изолятами штамма EU. Для праймеров PepMV CP-7F/PepMV CP-2R (НМОВ ВНИИКР) и pepF2/pepR (Candresse et al., 2010) установлена преимущественная реакция

к the reverse transcription reagent kit by Agrodiagnostica (results not shown). For all the primer pairs tested, no nonspecific reaction was observed with isolates of the non-targeted potexvirus isolates of CIYMV, CymMV, HRSV, AltMV, PAMV and PVX, indicating their high specificity for PepMV. All primers reacted with the vaccine preparation V10 (Valto, the Netherlands), which contains a mixture of weakly pathogenic PepMV isolates of strains EU and CH2 (Fig. 6).

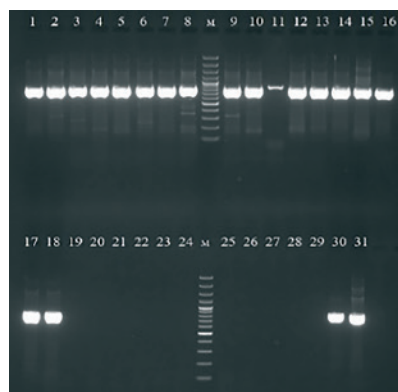
Based on the results of the experiments, the possibility of using primers PepCP-D/PepCP-R (Pagan et al., 2006) for universal detection of isolates of all PepMV strains was established. The PepTGB-F/PepUTR-R primers (Mumford and Metcalfe, 2001) are characterized by a reaction with the Peruviav, EU, and CH2 strains, but there is no reaction with the CH1/US1 strain. Pep3/Pep4 primers (Souiri et al., 2017) reacted only with EU strain isolateS. For primers PepMV CP-7F/PepMV CP-2R (NMOV VNIKR) and pepF2/pepR (Candresse et al., 2010), a preferential reaction with PepMV isolates of strain CH2 was established, but the possibility of



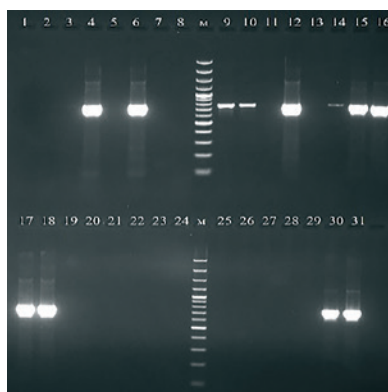
а) Праймеры PepTGB-F/PepUTR-R
a) Primers PepTGB-F/PepUTR-R



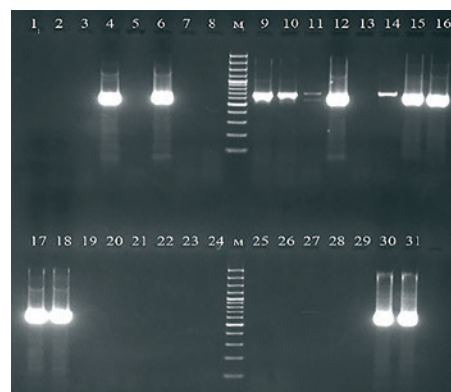
б) Праймеры Pep3/Pep4
b) Primers Pep3/Pep4



с) Праймеры PepCP-D/PepCP-R
c) Primers PepCP-D/PepCP-R



д) Праймеры pepF2/pepR
d) Primers pepF2/pepR



е) Праймеры PepMV CP-7F/PepMV CP-2R
e) Primers PepMV CP-7F/PepMV CP-2R

Образцы: 1. PepMV pv-0554 (EU/ Peruvian); 2. PepMV PV-0577 (EU); 3. PepMV PV-0578 (EU); 4. PepMV PV-0632 (CH2); 5. PepMV PV-0674 (EU); 6. PepMV PV-0716 (CH2); 7. PepMV PV-0730 (EU + CH1); 8. PepMV PV-0750 (EU); 9. PepMV PV-0751 (EU); 10. PepMV PV-0973 (EU); 11. PepMV PV-0975 (CH1/US1); 12. PepMV PV-1022 (CH2); 13. PepMV PV-1110 (EU); 14. PepMV PV-1125 (EU); 15. PepMV (вакцина V10); 16. Томат (с/п 34958435); 17. Томат (с/п 34958436); 18. Томат (с/п 34958437); 19. PVX PV-0014; 20. PVX PV-0020; 21. PVX PV-0847; 22. CIYMV PV-0851; 23. CymMV PV-0334; 24. HRSV PV-0372; 25. AltMV PV-0849; 26. PAMV PV-0007; 27–29. – отрицательный контроль (вода); 30. положительный контроль (смесь изолятов PepMV); 31. PepMV (вакцина V10).

Samples: 1. PepMV pv-0554 (EU/ Peruvian); 2. PepMV PV-0577 (EU); 3. PepMV PV-0578 (EU); 4/ PepMV PV-0632 (CH2); 5. PepMV PV-0674 (EU); 6. PepMV PV-0716 (CH2); 7. PepMV PV-0730 (EU + CH1); 8. PepMV PV-0750 (EU); 9. PepMV PV-0751 (EU); 10. PepMV PV-0973 (EU); 11. PepMV PV-0975 (CH1/US1); 12. PepMV PV-1022 (CH2); 13. PepMV PV-1110 (EU); 14. PepMV PV-1125 (EU); 15. PepMV (vaccine V10); 16. Tomato (s/p 34958435); 17. Tomato (s/p 34958436); 18. Tomato (s/p 34958437); 19. PVX PV-0014; 20. PVX PV-0020; 21. PVX PV-0847; 22. CIYMV PV-0851; 23. CymMV PV-0334; 24. HRSV PV-0372; 25. AltMV PV-0849; 26. PAMV PV-0007; 27–29. – negative control (water); 30. positive control (mixture of PepMV isolates); 31. PepMV (vaccine V10).

Рис. 6. Определение специфичности пяти пар праймеров к PepMV с использованием кДНК, синтезированной набором реагентов для обратной транскрипции фирм Евроген (верхний ряд гелей) и Агродиагностика (нижний ряд гелей)

Fig. 6. Determination of the specificity of five pairs of primers to PepMV using cDNA synthesized with a reagents kit for reverse transcription by Evrogen (top row of gels) and Agrodiagnostica (bottom row of gels)

Табл. 2. Выявление изолятов различных штаммов PepMV методом 2-этапной ОТ-ПЦР-РВ с праймерами KL05-48 F1/KL05-49 F2/KL05-51 R1/KL05-52 R2 и зондом KL05-50 probe (Ling 2007)

Table. 2. Detection of isolates of various PepMV strains by 2-step RT-RTR-RT with primers KL05-48 F1/KL05-49 F2/KL05-51 R1/KL05-52 R2 and probe KL05-50 probe (Ling 2007)

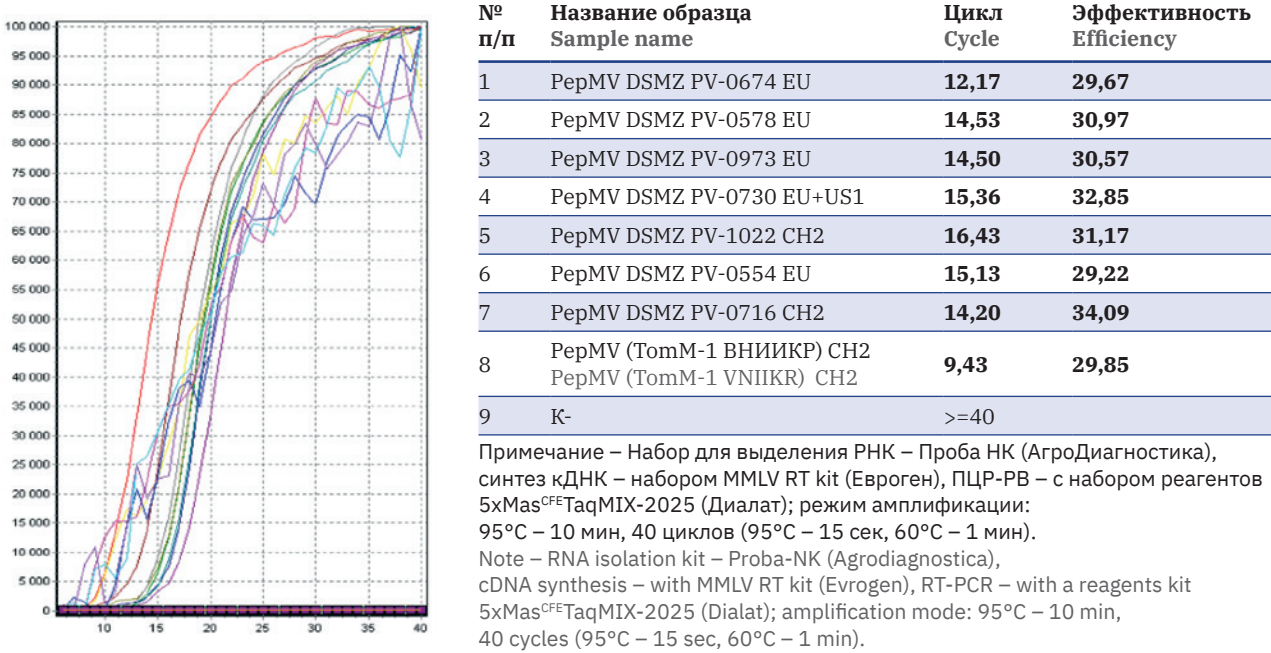


Табл. 3. Определение штаммспецифичности праймеров и зондов Eur-rep F/Eur-rep R/Eur-rep P, Ch2-US2-cp F/Ch2-US2-cp R/Ch2-US2-cp P и US1-cp F/US1-cp R/US1-cp P (Gutierrez-Aguirre et al., 2009)

Table 3. Determination of strain specificity of primers and probes Eur-rep F/Eur-rep R/Eur-rep P, Ch2-US2-cp F/Ch2-US2-cp R/Ch2-US2-cp P and US1-cp F/US1-cp R/US1-cp P (Gutierrez-Aguirre et al., 2009)

№ п/п	Изоляты PepMV PepMV isolates	Cq в экспериментах с праймерами: Cq in experiments with primers:		
		а) Eur-rep	б) Ch2-US2-cp	в) US1-cp
1	PV-0554 (Eu/Peru)	20,16	0,00	0,00
2	PV-0577 (Eu)	18,24	0,00	0,00
3	PC-0578 (Eu)	21,00	0,00	0,00
4	PV-0632 (Ch2)	0,00	14,34	0,00
5	PV-0674 (Eu)	18,48	0,00	0,00
6	PC-0716 (Ch2)	0,00	13,97	0,00
7	PV-0730 (EU+CH1/US1)	19,57	0,00	38,19
8	PV-0750 (Eu)	19,88	0,00	31,85
9	PV-0751 (Eu)	16,98	27,34	0,00
10	PV-0973 (Eu)	18,04	28,17	34,17
11	PV-0975 (Ch1/Us1)	0,00	38,49	11,27
12	PC-1022 (Ch2)	0,00	12,34	27,91
13	PV-1110 (Eu)	17,76	0,00	27,62
14	PV-1125 (Eu)	25,11	0,00	0,00
15	К- (вода)	0,00	0,00	0,00

*Примечание: выделение РНК – Проба-НК (Агродиагностика), синтез кДНК – MMLV RT Kit (Евроген), ПЦР-РВ – qPCRmix-HS (Евроген).
 * Note: RNA isolation – Proba-NK (Agrodiagnostica), cDNA synthesis – MMLV RT Kit (Evrogen), RT-PCR – qPCRmix-HS (Evrogen).

с изолятами ПерМВ штамма CH2, но констатирована также возможность реакции с отдельными изолятами штаммов EU и CH1/US1 (Рис. 2).

Было подтверждено также, что праймеры KL05-48 F1/ KL05-49 F2/ KL05-51 R1/ KL05-52 R2 и зонд KL05-50 probe (Ling et al., 2007), рекомендуемые в диагностическом протоколе ЕОКЗР РМ РМ 7/113 (1) (ЕРРО, 2013), позволяют диагностировать изоляты всех основных штаммов ПерМВ (таблица 2).

На заключительном этапе работы было проведено испытание праймеров и зондов Eur-rep F/Eur-rep R/Eur-rep P, Ch2-US2-cp F/Ch2-US2-cp R/Ch2-US2-cp P и US1-cp F/US1-cp R/US1-cp P (Gutierrez-Aguirre et al., 2009), разработанных в Испании для выявления и дифференциации штаммов EU, CH2 и CH1/US1 ПерМВ методом TaqMan ОТ-ПЦР-РВ. Эксперименты проводили с набором реагентов qPCRmix-HS (Евроген) и кДНК, синтезированной набором MMLV RT Kit (Евроген).

Установлена высокая штаммспецифичность праймеров и зонда Eur-rep F/Eur-rep R/Eur-rep P, которые реагировали лишь с изолятами штаммов EU/Peruvian (таблица 3).

В эксперименте с праймерами и зондом Ch2-US2-cp F/Ch2-US2-cp R/Ch2-US2-cp P, наряду с положительным сигналом для изолятов штамма CH2, наблюдалась также реакция с отдельными изолятами штаммов EU и Ch1/Us1. Праймеры и зонд US1-cp F/US1-cp R/US1-cp P также реагировали не только с изолятами целевого штамма CH1/US1, но и с некоторыми изолятами штаммов EU и CH2 (таблица 3). Не исключена возможность, что некоторые изоляты ПерМВ DSMZ представляют собой смешанную инфекцию штаммов этого вируса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено испытание 13 пар праймеров для выявления вируса мозаики пегино (ПерМВ) в различных форматах ОТ-ПЦР. Установлено, что праймеры ПерСР-D/ПерСР-R (Pagan et al., 2006) и Пер5383F/Пер5584R (Groen Agro Control Lab), а также праймеры KL05-48 F1/KL05-49 F2/KL05-51 R1/KL05-52 R2 с зондом KL05-50 probe (Ling et al., 2007) позволяют осуществлять универсальное выявление изолятов всех штаммов ПерМВ. Для праймеров и зонда Eur-rep F/Eur-rep R/Eur-rep P (Gutierrez-Aguirre et al., 2009) и праймеров Пер3/Пер4 (Souiri et al., 2017) установлено наличие высокой специфичности к штаммам Eu/Peruvian этого вируса. Констатируется необходимость дальнейшего скрининга праймеров для высокоспецифичного определения штаммов CH1/US1 и CH2 ПерМВ. Определена штаммовая принадлежность ряда изолятов вируса мозаики пегино из коллекции DSMZ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шнейдер Ю.А., Каримова Е.В., Приходько Ю.Н., Лозовая Е.Н., Живаева Т.С. Вирусы томата, особо опасные для овощеводства России. // Картофель и овощи. – 2021. – № 6. – С. 3–8.
2. Candresse T., Marais A., Faure C., Dubrana M.P., Gombert J., Bendahmane A. Multiple coat protein mutations abolish recognition of Pepino mosaic potexvirus (PepMV) by the potato Rx resistance gene

reaction with individual isolates of strains EU and CH1/US1 was also stated (Fig. 2).

It was also confirmed that the primers KL05-48 F1/ KL05-49 F2/ KL05-51 R1/ KL05-52 R2 and the KL05-50 probe (Ling et al., 2007), recommended in the EPPO PM PM 7/113 diagnostic protocol (1) (EPPO, 2013), allow the diagnosis of isolates of all major PepMV strains (Table 2).

At the final stage of the work, primers and probes Eur-rep F/Eur-rep R/Eur-rep P, Ch2-US2-cp F/Ch2-US2-cp R/Ch2-US2-cp P and US1-cp F/US1-cp R/US1-cp P (Gutierrez-Aguirre et al., 2009), developed in Spain for the detection and differentiation of PepMV strains EU, CH2 and CH1/US1 using TaqMan RT-RT-PCR. Experiments were performed with the qPCRmix-HS reagent kit (Evrogen) and cDNA synthesized with the MMLV RT Kit (Evrogen).

High strain specificity of the primers and probe Eur-rep F/Eur-rep R/Eur-rep P was established, which reacted only with isolates of EU/Peruvian strains (Table 3).

In the experiment with primers and probe Ch2-US2-cp F/Ch2-US2-cp R/Ch2-US2-cp P, along with a positive signal for isolates of strain CH2, a reaction was also observed with individual isolates of strains EU and Ch1/Us1. The primers and probe US1-cp F/US1-cp R/US1-cp P also reacted not only with isolates of the target strain CH1/US1, but also with some isolates of strains EU and CH2 (Table 3). It is possible that some PepMV DSMZ isolates represent a mixed infection of strains of this virus.

CONCLUSION

Thirteen pairs of primers were tested for the detection of pepino mosaic virus (PepMV) in various RT-PCR formats. It was found that primers PepCP-D/PepCP-R (Pagan et al., 2006) and Pep5383F/Pep5584R (Groen Agro Control Lab), as well as primers KL05-48 F1/KL05-49 F2/KL05-51 R1/KL05-52 R2 with the KL05-50 probe (Ling et al., 2007) allow universal detection of isolates of all PepMV strains. For primers and probe Eur-rep F/Eur-rep R/Eur-rep P (Gutierrez-Aguirre et al., 2009) and primers Pep3/Pep4 (Souiri et al., 2017), high specificity for Eu/Peruvian strains of this virus was established. The need for further screening of primers for highly specific determination of PepMV CH1/US1 and CH2 strains was stated. The strain affiliation of some PepMV isolates from the DSMZ collection was determined.

REFERENCES

1. Shneyder Yu.A., Karimova E.V., Prikhodko Yu.N., Lozovaya E.N., Zhivaeva T.S. Tomato viruses especially dangerous for vegetable growing of Russia [Virusy tomata, osobo opasnyye dlya ovoshchevodstva Rossii]. // Potato and VegetableS. 2021; 6: 3–8. (In Russian)
2. Candresse T., Marais A., Faure C., Dubrana M.P., Gombert J., Bendahmane A. Multiple coat protein mutations abolish recognition of Pepino mosaic potexvirus (PepMV) by the potato Rx resistance gene in transgenic tomatoes// MPMI. – 2010. – Vol. 23 (4). – P. 376–383.
3. Córdoba-Sellés M.C., García-Rández A., Alfaro-Fernández A., Jordá-Gutiérrez C. Seed transmission

in transgenic tomatoes// MPMI. – 2010. – Vol. 23 (4). – P. 376–383.

3. Córdoba-Sellés M.C., García-Ráñez A., Alfaro-Fernández A., Jordá-Gutiérrez C. Seed transmission of Pepino mosaic virus and efficacy of tomato seed disinfection treatments // Plant Disease. – 2007. – Vol. 91 (10). – P. 1250–1254.

4. EPPO, 2013. PM 7/113 (1) Pepino mosaic virus. Diagnostics // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2013. – Vol.43 (1). – P.94–104.

5. Gutiérrez-Aguirre I., Mehle N., Delic D., Grudena K., Mumford R., Ravnika M. Real-time quantitative PCR based sensitive detection and genotype discrimination of Pepino mosaic virus // Journal of Virological Methods. – 2009. – Vol. 162. – P. 46–55.

6. Hanssen I.M., Mumford R., Blystad D.R., Cortez I., Hasiów-Ajaroszevska B., Hristova D., Pagán I., Pereira A.M., Peters J., Pospieszny H., Ravnika M., Stijger I., Tomassoli L., Varveri C., Vlugt R.A.A., Nielsen S.L. Seed transmission of Pepino mosaic virus in tomato // European Journal of Plant Pathology. – 2010. – Vol. 126. – P. 2010–2020.

7. Jones R.A.C., Koenig R., Lesemann D.E. Pepino mosaic virus, a new potexvirus from pepino (*Solanum muricatum*) // Annals of Applied Biology. – 1980. – Vol. 94. – P. 61–68.

8. Lacasa A., Guerrero M.M., Hita I., Martínez M.A., Jordá C., Bielza P., Contreras J., Alcázar A., Cano A. Implication of bumble bees (*Bombus* spp.) on Pepino mosaic virus (PepMV) spread on tomato crops // Plagas. – 2003. –Vol.29. – P. 393–403.

9. Ling K.-S., Li R. and Bledsoe M. Pepino mosaic virus genotype shift in North America and development of a loop-mediated isothermal amplification for rapid genotype identification // Virology Journal. – 2013. – Vol. 10. – P. 117–124.

10. Ling K.-S., Wechter W.P., Jordan R. Development of a one-step immunocapture real-time TaqMan RT-PCR assay for the broad spectrum detection of Pepino mosaic virus// Journal of Virological Methods. – 2007. – Vol. 144. – P. 65–72.

11. Mehle N., Gutiérrez-Aguirre I., Prezelj N., Delic D., Vidic U., Ravnika M. Survival and transmission of Potato virus Y, Pepino mosaic virus, and Potato spindle tuber viroid in water // Appl. Environ. Microbiol. – 2014. – Vol. 80 (4). – P. 1455–1462.

12. Moerkens R., Van Damme V., Berckmoes E., Ortega-Parra N. High population densities of *Macrolophus pygmaeus* on tomato plants can cause economic fruit damage: Interaction with Pepino mosaic virus? // Pest Management Science. – 2015. – Vol.72 (7). – P. 1350–1358.

13. Mumford R.A., Jones R.A.C. Pepino mosaic virus / CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses. – 2005. – №411. – 9 sp.

14. Mumford R.A., Metcalfe E.J. The partial sequencing of the genomic RNA of a UK isolate of Pepino mosaic virus and the comparison of the coat protein sequence with other isolates from Europe and Peru // Arch Virol. – 2001. – Vol. 146 (12). – P. 2455–2460.

15. Pagán I., Córdoba-Sellés M.C., Martínez-Priego L., Fraile A., Malpica J.M., Jordá C., García-Arenal F. Genetic structure of the population of Pepino mosaic virus infecting tomato crops in Spain // Phytopathology. – 2006. – Vol.96. – P.274–279.

of Pepino mosaic virus and efficacy of tomato seed disinfection treatments // Plant Disease. – 2007. – Vol. 91 (10). – P. 1250–1254.

4. EPPO, 2013. PM 7/113 (1) Pepino mosaic virus. Diagnostics // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2013. – Vol.43 (1). – P.94–104.

5. Gutiérrez-Aguirre I., Mehle N., Delic D., Grudena K., Mumford R., Ravnika M. Real-time quantitative PCR based sensitive detection and genotype discrimination of Pepino mosaic virus // Journal of Virological Methods. – 2009. – Vol. 162. – P. 46–55.

6. Hanssen I.M., Mumford R., Blystad D.R., Cortez I., Hasiów-Ajaroszevska B., Hristova D., Pagán I., Pereira A.M., Peters J., Pospieszny H., Ravnika M., Stijger I., Tomassoli L., Varveri C., Vlugt R.A.A., Nielsen S.L. Seed transmission of Pepino mosaic virus in tomato // European Journal of Plant Pathology. – 2010. – Vol. 126. – P. 2010–2020.

7. Jones R.A.C., Koenig R., Lesemann D.E. Pepino mosaic virus, a new potexvirus from pepino (*Solanum muricatum*) // Annals of Applied Biology. – 1980. – Vol. 94. – P. 61–68.

8. Lacasa A., Guerrero M.M., Hita I., Martínez M.A., Jordá C., Bielza P., Contreras J., Alcázar A., Cano A. Implication of bumble bees (*Bombus* spp.) on Pepino mosaic virus (PepMV) spread on tomato crops // Plagas. – 2003. –Vol.29. – P. 393–403.

9. Ling K.-S., Li R. and Bledsoe M. Pepino mosaic virus genotype shift in North America and development of a loop-mediated isothermal amplification for rapid genotype identification // Virology Journal. – 2013. – Vol. 10. – P. 117–124.

10. Ling K.-S., Wechter W.P., Jordan R. Development of a one-step immunocapture real-time TaqMan RT-PCR assay for the broad spectrum detection of Pepino mosaic virus// Journal of Virological Methods. – 2007. – Vol. 144. – P. 65–72.

11. Mehle N., Gutiérrez-Aguirre I., Prezelj N., Delic D., Vidic U., Ravnika M. Survival and transmission of Potato virus Y, Pepino mosaic virus, and Potato spindle tuber viroid in water // Appl. Environ. Microbiol. – 2014. – Vol. 80 (4). – P. 1455–1462.

12. Moerkens R., Van Damme V., Berckmoes E., Ortega-Parra N. High population densities of *Macrolophus pygmaeus* on tomato plants can cause economic fruit damage: Interaction with Pepino mosaic virus? // Pest Management Science. – 2015. – Vol.72 (7). – P. 1350–1358.

13. Mumford R.A., Jones R.A.C. Pepino mosaic virus / CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses. – 2005. – №411. – 9 sp.

14. Mumford R.A., Metcalfe E.J. The partial sequencing of the genomic RNA of a UK isolate of Pepino mosaic virus and the comparison of the coat protein sequence with other isolates from Europe and Peru // Arch Virol. – 2001. – Vol. 146 (12). – P. 2455–2460.

15. Pagán I., Córdoba-Sellés M.C., Martínez-Priego L., Fraile A., Malpica J.M., Jordá C., García-Arenal F. Genetic structure of the population of Pepino mosaic virus infecting tomato crops in Spain // Phytopathology. – 2006. – Vol.96. – P. 274–279.

16. Shipp J.L., Buitenhuis R., Stobbs L., Wang K., Kim W.S., Ferguson G. Vectoring of Pepino mosaic virus by bumble bees in tomato greenhouses // *Annals of Applied Biology*. – 2008. – Vol.153. – P. 149–155.

17. Shneyder Y., Morozova O., Tikhomirova M., Karimova E., Prikhodko Y. Methods of diagnostic of Pepino mosaic virus in Russian Federation / Abstracts of the V International Symposium on Tomato Diseases: Perspectives and Future Directions in Tomato Protection. Malaga, Spain. – 2016. – P. 91.

18. Souiri A., Zemzami M., Khataby K., Laatiris H., Amzazi S., Ennaji M.M. A simple, rapid and efficient method of Pepino mosaic virus RNA isolation from tomato fruit // *J Plant Pathol Microbiol*. – 2017. – 8: 395. doi: 10.4172/2157-7471.1000395.

19. Stobbs L.W., Greig N., Weaver S., Shipp L., Ferguson G. The potential role of native weed species and bumble bees (*Bombus impatiens*) on the epidemiology of Pepino mosaic virus // *Canadian Journal of Plant Pathology*. – 2010. – Vol. 31. – P. 254–261.

20. EPPO, 2024. Pepino mosaic virus. EPPO data-sheets on pests recommended for regulation. <https://gd.eppo.int> (дата обращения 2024-03-14).

21. Groen Agro Control Lab., 2013. Validation of qRT-PCR-assay to identify mild variants of PepMV and semi-quantify the ratio of mild variants relative to total PepMV. https://publications.gc.ca/collections/collection_2019/sc-hc/h113-9/H113-9-2019-10-eng.pdf (дата обращения 2024-02-14).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

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

Пручкина Мария Александровна, аспирант, агроном отдела фитосанитарных рисков и международного взаимодействия ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; *e-mail: anadiamena@gmail.com*.

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

Шнейдер Юрий Андреевич, кандидат биологических наук, начальник научно-методического отдела вирусологии, 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. о. Раменский, Московская обл., Россия; *ORCID 0000-0001-6474-8913, e-mail: elenavkar@mail.ru*.

16. Shipp J.L., Buitenhuis R., Stobbs L., Wang K., Kim W.S., Ferguson G. Vectoring of Pepino mosaic virus by bumble bees in tomato greenhouses // *Annals of Applied Biology*. – 2008. – Vol. 153. – P. 149–155.

17. Shneyder Y., Morozova O., Tikhomirova M., Karimova E., Prikhodko Y. Methods of diagnostic of Pepino mosaic virus in Russian Federation / Abstracts of the V International Symposium on Tomato Diseases: Perspectives and Future Directions in Tomato Protection. Malaga, Spain. – 2016. – P. 91.

18. Souiri A., Zemzami M., Khataby K., Laatiris H., Amzazi S., Ennaji M.M. A simple, rapid and efficient method of Pepino mosaic virus RNA isolation from tomato fruit // *J Plant Pathol Microbiol*. – 2017. – 8: 395. doi: 10.4172/2157-7471.1000395.

19. Stobbs L.W., Greig N., Weaver S., Shipp L., Ferguson G. The potential role of native weed species and bumble bees (*Bombus impatiens*) on the epidemiology of Pepino mosaic virus // *Canadian Journal of Plant Pathology*. – 2010. – Vol. 31. – P. 254–261.

20. EPPO, 2024. Pepino mosaic virus. EPPO data-sheets on pests recommended for regulation. <https://gd.eppo.int> (last accessed 2024-03-14).

21. Groen Agro Control Lab., 2013. Validation of qRT-PCR-assay to identify mild variants of PepMV and semi-quantify the ratio of mild variants relative to total PepMV. https://publications.gc.ca/collections/collection_2019/sc-hc/h113-9/H113-9-2019-10-eng.pdf (last accessed 2024-02-14).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

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

Maria Pruchkina, PhD student, Agronomist of Pest Risk and International Cooperation Department, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; *e-mail: anadiamena@gmail.com*.

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

Yuri Shneyder, PhD in Biology, Head of Research and Methodology Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNIKR”, 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 “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; *ORCID 0000-0001-6474-8913, e-mail: elenavkar@mail.ru*.