

Генетические особенности изолятов вируса коричневой морщинистости плодов томата (ToBRFV), распространенных в Российской Федерации и сопредельных странах

* ЛОЗОВАЯ Е.Н.¹, ЖИВАЕВА Т.С.²,
ПРИХОДЬКО Ю.Н.³, ШНЕЙДЕР Ю.А.⁴,
БАШКИРОВА И.Г.⁵, КАРИМОВА Е.В.⁶

^{1, 2, 3, 4, 5, 6} ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково,
г. о. Раменский, Московская обл., Россия, 140150

¹ e-mail: evgeniyaf@mail.ru

² e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru

³ e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru

⁴ ORCID ID: 0000-0002-7565-1241,
e-mail: yury.shneyder@mail.ru

⁵ ORCID ID: 0000-0001-9014-4179,
e-mail: bashkirova@mail.ru

⁶ ORCID ID: 0000-0001-6474-8913,
e-mail: elenavkar@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Вирус коричневой морщинистости плодов томата (Tomato brown rugose fruit virus, или *Tobamovirus fructirugosum*, ToBRFV) является карантинным объектом ЕАЭС, ЕОКЗР и целого ряда стран мира. Вирус заражает томат, перец и несколько видов сорных растений. Потери урожая плодов томата в результате заражения ToBRFV могут достигать 70%. Из-за развития интенсивной некротизации и деформации плоды зараженных растений становятся непригодными для продажи.

Вирус коричневой морщинистости плодов томата характеризуется многообразием путей распространения и способен длительное время сохраняться в растительных остатках, почве, воде, растворах для гидропоники и на различных инертных поверхностях. Важное значение в распространении вируса коричневой морщинистости плодов томата имеет семенная инфекция.

В соответствии с национальным докладом в Российской Федерации вирус коричневой морщинистости плодов томата впервые был выявлен в 2023 г., что обусловило необходимость установления 5 карантинных фитосанитарных зон в 4 субъектах Российской Федерации. В 2024 г. наблюдалось дальнейшее расширение его ареала.

Важнейшей предпосылкой для предотвращения распространения фитопатогенных вирусов является установление источников их инфекции, что может быть достигнуто сравнением последовательности нуклеотидов у выявленных изолятов

Genetic characteristics of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) isolates in the Russian Federation and neighboring countries

* EVGENIYA N. LOZOVAYA¹, TATIANA S. ZHIVAIEVA²,
YURI N. PRIKHODKO³, YURI A. SHNEYDER⁴,
IDA G. BASHKIROVA⁵, ELENA V. KARIMOVA⁶

^{1, 2, 3, 4, 5, 6} FGBU "All-Russian Plant Quarantine Center" (FGBU "VNIKIR"), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia, 140150

¹ e-mail: evgeniyaf@mail.ru

² e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru

³ e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru

⁴ ORCID ID: 0000-0002-7565-1241,
e-mail: yury.shneyder@mail.ru

⁵ ORCID ID: 0000-0001-9014-4179,
e-mail: bashkirova@mail.ru

⁶ ORCID ID: 0000-0001-6474-8913,
e-mail: elenavkar@mail.ru

ABSTRACT

Tomato brown rugose fruit virus or *Tobamovirus fructirugosum* (ToBRFV) is a quarantine pest of the EAEU, EPPO and some other countries. The virus affects tomatoes, peppers and several weed species. Yield losses of tomato fruits as a result of infection with ToBRFV can reach 70%. Due to the development of intensive necrosis and deformation, the fruits of infected plants become unmarketable.

ToBRFV is characterized by a variety of pathways and is capable of remaining for a long time in plant residues, soil, water, hydroponic solutions and on various inert surfaces. Seed infection is of great importance in the spread of ToBRFV.

According to the national report, ToBRFV was first detected in the Russian Federation in 2023, which accounted for 5 quarantine phytosanitary areas in 4 constituent entities of the Russian Federation. In 2024, a further expansion of its area was observed.

The most important prerequisite for preventing the spread of phytopathogenic viruses is the identification of their infection sources, which can be achieved

и изолятов данного патогена различного географического происхождения.

В настоящей статье приведены результаты изучения генетических особенностей изолятов вируса коричневой морщинистости плодов томата, выявленных в Ставропольском крае, Волгоградской и Московской областях, Республике Казахстан и Республике Узбекистан.

Ключевые слова. Молекулярная диагностика, полимеразная цепная реакция, праймер, секвенирование, филогенетический анализ.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус коричневой морщинистости плодов томата (Tomato brown rugose fruit virus, или *Tobamovirus fructirugosum*, ToBRFV) – представитель рода *Tobamovirus* семейства *Virgaviridae*. В связи со своей высокой опасностью и быстрым распространением ToBRFV регулируется в качестве карантинного объекта во многих странах и организациях, в том числе в ЕАЭС и ЕОКЗР (Лозовая и др., 2022).

Экономически значимыми растениями – хозяевами ToBRFV являются томат (*Solanum lycopersicum*) и перец (*Capsicum annuum*). Вредоносность ToBRFV усугубляется его способностью заражать растения томатов (см. рис. 1) с генами устойчивости Tm и растения перца с аллелями устойчивости L, обеспечивающими устойчивость к другим тобамовирусам (Salem et al., 2023). Вирус способен заражать также несколько повсеместно распространенных сорных растений, таких как амарант запрокинутый (*Amaranthus retroflexus*), вьюнок полевой (*Convolvulus arvensis*), кислица рожковая (*Oxalis corniculata*), марь постенная (*Chenopodium murale*), мелколепестник канадский (*Erigeron canadensis*), одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale*), паслен черный (*Solanum nigrum*), портулак огородный (*Portulaca oleracea*), и ряд других (EPPO, 2025).

Впервые ToBRFV был выявлен на томате в Иордании в 2015 г. (Salem et al., 2016). Однако до этого, в 2014 г., на юге Израиля наблюдалась вспышка нового заболевания, поражающего устойчивые сорта томата (Каримова и др., 2020a). Позднее было установлено, что причиной заболевания стал израильский изолят ToBRFV с высокой степенью идентичности геномной последовательности с иорданским изолятом (Luria et al., 2017). В 2018 г. ToBRFV был выявлен в Германии, Италии, Мексике и США, а в 2019 г. – в Великобритании, Греции, Египте, Китае, Нидерландах и Турции (Salem et al., 2023). В настоящее время ToBRFV распространен в 48 странах на всех континентах, за исключением Антарктиды (EPPO, 2025). Многие из этих стран являются экспортерами семян и плодов томата и перца в Российскую Федерацию. В Российской Федерации ToBRFV впервые был выявлен в 2023 г. (Национальный доклад, 2024), а в 2024 г. наблюдалось дальнейшее расширение его ареала (Национальный доклад, 2025).

by comparing the nucleotide sequence of the identified isolates and isolates of a given pathogen of different geographic origins.

This article presents the results of a study of the genetic characteristics of the ToBRFV isolates identified in Stavropol Krai, Volgograd Oblast and Moscow Oblast, the Republic of Kazakhstan and the Republic of Uzbekistan.

Key words. Molecular diagnosis, polymerase chain reaction, primer, sequencing, phylogenetic analysis.

INTRODUCTION

Tomato brown rugose fruit virus or *Tobamovirus fructirugosum* (ToBRFV) is a representative of the genus *Tobamovirus* of the *Virgaviridae* family. Due to its danger and rapid spread, ToBRFV is regulated as a quarantine pest in many countries and organizations, including the EAEU and EPPO (Lozovaya et al., 2022).

Economically significant host plants of ToBRFV are tomato (*Solanum lycopersicum*) and pepper (*Capsicum annuum*). The harmfulness of ToBRFV is further enhanced by its ability to infect tomato plants (see Fig. 1) with Tm resistance genes and pepper plants with L resistance alleles that provide resistance to other tobamoviruses (Salem et al., 2023). The virus can also infect several common weeds, such as *Amaranthus retroflexus*, *Convolvulus arvensis*, *Oxalis corniculata*, *Chenopodium murale*, *Erigeron canadensis*, *Taraxacum officinale*, *Solanum nigrum*, *Portulaca oleracea*, etc. (EPPO, 2025).

ToBRFV was first detected on tomato in Jordan in 2015 (Salem et al., 2016). However, before that, in 2014, an outbreak of a new disease affecting resistant tomato varieties was observed in southern Israel (Karimova et al., 2020a). The disease was later identified as being caused by an Israeli ToBRFV isolate with a high degree of genomic sequence identity to the Jordanian isolate (Luria et al., 2017). In 2018, ToBRFV was detected in Germany, Italy, Mexico, and the United States, and in 2019 in the United Kingdom, Greece, Egypt, China, the Netherlands, and Turkey (Salem et al., 2023). ToBRFV is currently distributed in 48 countries on all continents except Antarctica (EPPO, 2025). Many of these countries are exporters of tomato and pepper seeds and fruits to the Russian Federation. In the Russian Federation, ToBRFV was first detected in 2023 (National Report, 2024), and further expansion of its range was observed in 2024 (National Report, 2025).

Naturally, such a rapid propagation of ToBRFV was due to its ability to spread efficiently with seeds. Seeds isolated from infected tomato fruits can be 100% infected with the virus (Salem et al., 2022). Vertical transmission of the virus from infected seeds to seedlings is relatively low and varies from 0.08 to 2.8% (Davino et al., 2020; Salem et al., 2022). However, even a few infected seedlings become sources for the

Безусловно, столь быстрое распространение ToBRFV было обусловлено его способностью эффективно распространяться с семенами. Семена, выделенные из зараженных плодов томата, могут быть заражены вирусом на 100% (Salem et al., 2022). Вертикальная передача вируса от зараженных семян к сеянцам является относительно невысокой и варьирует от 0,08 до 2,8% (Davino et al., 2020; Salem et al., 2022). Однако даже немногочисленные заразившиеся растения рассады становятся источниками для последующего распространения вируса. При выполнении различных сельскохозяйственных работ вирус может передаваться механическим путем через руки, одежду, обувь и инструменты рабочих, с поливной водой и растворами для гидропоники, а также при прямом контакте зараженных и незараженных растений (Каримова и др., 2020b, Шнейдер и др., 2021). Установлено, что при наличии всего двух растений томата, инфицированных ToBRFV, на теплицу площадью 0,5 га наблюдалось заражение 1,45; 80 и 100% растений через 1, 4 и 8 месяцев соответственно (Panno et al., 2020).

Вирионы тобамовирусов чрезвычайно стабильны и могут выживать вне хозяина на инертных (например, картон, поддоны, стекло, бетон, инструменты, одежда, транспортные средства) и биологических поверхностях (например, человеческие руки, остатки растений, насекомые-опылители), а также в питательных растворах, воде и почве в течение месяцев, не теряя своей вирулентности (Smit et al., 2019). В частности, показано, что ToBRFV может выживать на коже и перчатках не менее 2 часов,

subsequent spread of the virus. During various agricultural activities, the virus can be transmitted mechanically through the hands, clothes, shoes and tools of workers, with irrigation water and hydroponic solutions, as well as through direct contact of infected and uninfected plants (Karimova et al., 2020b, Schneider et al., 2021). It has been found that with only two ToBRFV infected tomato plants in a 0.5 ha greenhouse, infection was observed in 1.45, 80 and 100% of plants after 1, 4 and 8 months, respectively (Panno et al., 2020).

Tobamovirus virions are extremely stable and can survive outside the host on inert (e.g. cardboard, pallets, glass, concrete, tools, clothing, vehicles) and biological surfaces (e.g. human hands, plant debris, pollinating insects), as well as in nutrient solutions, water and soil for months without losing their virulence (Smit et al., 2019). In particular, it has been shown that ToBRFV can survive on skin and gloves for at least 2 hours, in dried tomato plant juice on greenhouse surfaces (glass, aluminum, steel, hard plastic, polyethylene film) for at least 4 weeks and on concrete for more than a week (EPPO, 2025).

It has also been established that ToBRFV can be effectively spread by bumblebees and other pollinating insects (Levitzky et al., 2019).

Like other tobamoviruses, ToBRFV virions are rigid rod-shaped particles measuring 300 x 18 nm.

The ToBRFV genome consists of a single molecule of single-stranded plus-sense RNA approximately 6376–6394 nucleotides long, which contains four open reading frames (ORFs). The two 5'-terminal ORFs are translated directly from the genomic RNA. ORF1 encodes a 126-kDa protein (p126) that contains methyltransferase and helicase domains. Passage of a stop codon (UAG) (amber) between ORF1 and ORF2 results in the expression of a 183-kDa protein (p183) that contains an RNA-dependent RNA polymerase domain at its C-terminus. Both proteins are essential for viral replication. ORF3 and ORF4 are translated from 5'-capped subgenomic RNAs 1 and 2, which encode a 30-kDa transport protein (MP) and a 17.5-kDa coat protein (CP), respectively. Genetically, ToBRFV is most closely related to tomato mosaic virus (ToMV) and tobacco mosaic virus (TMV), with which it shares 81–82% nucleotide sequence identity (Salem et al., 2016).

MATERIALS AND METHODS

The objects of the study were ToBRFV isolates:

- detected in tomato plants collected in Stavropol Krai, Volgograd Oblast and Moscow Oblast in officially established quarantine phytosanitary areas for this pathogen (fsvps.gov.ru, 2025);
- detected in tomato plants in the Republic of Kazakhstan;
- identified in the Testing laboratory center of FGBU "VNIKR" in regulated tomato fruits from the Republic of Uzbekistan.

RNA extraction for reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using commercial RNA extraction kit Proba-NK (AgroDiagnostika, Russia) according to the manufacturer's instructions.



Рис. 1. Симптомы ToBRFV на плодах томата из Республики Казахстан (фото авторов)

Fig. 1. ToBRFV symptoms on tomato fruits from the Republic of Kazakhstan (photo by the authors)

а в высушенном соке растений томата на поверхностях теплиц (стекло, алюминий, сталь, твердый пластик, полиэтиленовая пленка) – не менее 4 недель и на бетоне – более недели (EPPO, 2025).

Установлено также, что ToBRFV может эффективно распространяться шмелями и другими насекомыми-опылителями (Levitzky et al., 2019).

Как и у других тобамовирусов, вирионы ToBRFV представляют собой жесткие палочковидные частицы величиной 300 x 18 нм.

Геном ToBRFV состоит из единственной молекулы одноцепочечной плюс-смысловой РНК длиной около 6376–6394 нуклеотидов, которая содержит четыре открытые рамки считывания (ОРС). Две 5'-концевые ОРС транслируются непосредственно с геномной РНК. ОРС1 кодирует белок массой 126 кДа (p126), который содержит домены метилтрансферазы и хеликазы. Прохождение стоп-кодона янтаря (UAG) между ОРС1 и ОРС2 приводит к экспрессии белка массой 183 кДа (p183), который содержит домен РНК-зависимой РНК-полимеразы на своем С-конце. Оба белка необходимы для репликации вируса. ОРС3 и ОРС4 транслируются с 5'-экспонированных субгеномных РНК 1 и 2, которые кодируют транспортный белок массой 30 кДа (MP) и белок оболочки массой 17,5 кДа (CP) соответственно. Генетически ToBRFV наиболее близок к тобамовирусам мозаики томата (ToMV) и табачной мозаики (TMV), с которыми имеет идентичность последовательности нуклеотидов на уровне 81–82% (Salem et al., 2016).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследований являлись изоляты ToBRFV:

- выявленные в растениях томата, отобранные в Ставропольском крае, Волгоградской и Московской областях в официально установленных карантинных фитосанитарных зонах для этого патогена (fsvps.gov.ru, 2025);
- выявленные в растениях томата в Республике Казахстан;
- выявленные в ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР» в подкарантинной продукции плодов томата из Республики Узбекистан.

Экстракцию РНК для проведения полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) проводили коммерческим набором реагентов Проба-НК (Агродиагностика, Россия) согласно инструкции фирмы-производителя.

Синтез кДНК осуществляли набором реагентов для обратной транскрипции MMLV RT kit (Евроген, Россия) согласно инструкции фирмы-производителя.

Образцы растений и плодов томата из Ставропольского края, Волгоградской области, Республики Казахстан и Республики Узбекистан тестировали методом ОТ-ПЦР с праймерами ToBRFV-F/ToBRFV-R (Alkowni et al., 2019) и набором реагентов 5x Mas^{DD}Mix-2025 (Диалат, Россия). Каждая реакция объемом 25 мкл содержала 5 мкл мастер-микса для ПЦР, 5 мкл кДНК, по 1 мкл каждого праймера и 13 мкл стерильной деионизированной воды. Температурно-временной режим составил: 95 °C – 5 мин, 40 циклов (95 °C – 30 сек, 58 °C – 30 сек, 72 °C – 60 сек).

cDNA synthesis was carried out using a kit of reagents for reverse transcription MMLV RT kit (Eurogen, Russia) according to the manufacturer's instructions.

Tomato plants and fruits samples from Stavropol Krai, Volgograd Oblast, the Republic of Kazakhstan and the Republic of Uzbekistan were tested by RT-PCR with ToBRFV-F/ToBRFV-R primers (Alkowni et al., 2019) and a 5x MasDDMix-2025 reagent kit (Dialat, Russia). Each 25 µl reaction contained 5 µl of PCR master mix, 5 µl of cDNA, 1 µl of each primer and 13 µl of sterile deionized water. The temperature-time regime was: 95 °C – 5 min, 40 cycles (95 °C – 30 sec, 58 °C – 30 sec, 72 °C – 60 sec).

Tomato plants and fruits samples from the Republic of Kazakhstan and the Republic of Uzbekistan were also tested by RT-PCR with primers ToBRT up1/ToBRT do2 (Dovas et al., 2004) and a 5x MasDDMix-2025 reagent kit (Dialat, Russia). Each 25 µl reaction contained 5 µl of PCR master mix, 3 µl of cDNA, 1 µl of each primer and 16 µl of sterile deionized water. The temperature-time regime was: 95 °C – 1 min, 40 cycles (95 °C – 15 sec, 49 °C – 20 sec, 72 °C – 60 sec).

The obtained amplicons were sequenced using a modified Sanger method on an AB-3500 genetic analyzer (Applied Biosystems, USA). The following software was used to analyze the obtained nucleotide sequences: BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999), BLASTN 2.12.0+ (ncbiinsights.ncbi.nlm.nih.gov) and Needleman-Wunsch Global Align Nucleotide Sequences (blast.ncbi.nlm.nih.gov). Phylogenetic analysis was performed using the MEGA11 software (Tamura et al., 2021).

For phylogenetic analysis, along with the identified isolates, the following ToBRFV isolates deposited in the NCBI Genbank were included: TBRFV-Ant-Tom (MT107885, Turkey), 39941596_A (MN882048, the Netherlands), Tom2M-Jo (MZ438228, Jordan), ToBRFV-SD (MT018320, China) and TBRFV-IL (KX619418, Israel). The ToMV isolate PV-0846 DSMZ (MW197140, Iran) was included as a phylogenetic outgroup.

Tomato plant samples from Moscow Oblast were tested by RT-PCR with ToBRFV F-5476/ToBRFV R-6287 primers (Levitzky et al., 2019) and the One Tube RT-PCR TaqMan reagent kit (Eurogen, Russia). Each 25 µl reaction contained 5 µl of PCR master mix, 3.5 µl of extracted RNA, 0.5 µl of each primer, 0.5 µl of MMLV reverse transcriptase, and 15 µl of sterile deionized water. The temperature and time regime were: 50 °C for 15 min, 95 °C for 1 min, 40 cycles (95 °C for 15 sec, 53 °C for 20 sec, 72 °C for 20 sec).

RESULTS AND DISCUSSION

ToBRFV-F/ToBRFV-R primers (Alkowni et al., 2019) recommended for the specific ToBRFV detection in the EPPO diagnostic protocol (EPPO, 2022) and the guidelines of FGBU "VNIICR" (No. 01-2020 MR VNIICR), allow amplification of a 560 bp section of the ToBRFV replicase gene. Using these primers allows effective diagnosis of the target object in tomato plant samples (Shneyder et al., 2022). As an example, Fig. 2 shows the results of one of the tests for detecting ToBRFV in tomato plant samples from Stavropol Krai.

Образцы растений и плодов томата из Республики Казахстан и Республики Узбекистан тестировали также методом ОТ-ПЦР с праймерами ToBRT up1/ToBRT do2 (Dovas et al., 2004) и набором реагентов 5x Mas^{DD}Mix-2025 (Диалат, Россия). Каждая реакция объемом 25 мкл содержала 5 мкл мастер микса для ПЦР, 3 мкл кДНК, по 1 мкл каждого праймера и 16 мкл стерильной деионизированной воды. Температурно-временной режим составил: 95 °C – 1 мин, 40 циклов (95 °C – 15 сек, 49 °C – 20 сек, 72 °C – 60 сек).

Полученные ампликоны секвенировали по модифицированному методу Сенгера на генетическом анализаторе AB-3500 (Applied Biosystems, США). Для анализа полученных нуклеотидных последовательностей использовали программное обеспечение BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999), BLASTN 2.12.0+ (ncbiinsights.ncbi.nlm.nih.gov) и Needleman-Wunsch Global Align Nucleotide Sequences (blast.ncbi.nlm.nih.gov). Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA11 (Tamura et al., 2021).

Для филогенетического анализа наряду с выявленными изолятами были включены следующие изоляты ToBRFV, депонированные в генбанке NCBI: TBRFV-Ant-Tom (MT107885, Турция), 39941596_A (MN882048, Нидерланды), Tom2M-Jo (MZ438228, Иордания), ToBRFV-SD (MT018320, Китай) и TBRFV-IL (KX619418, Израиль). Изолят тобамовируса мозаики томата ToMV PV-0846 DSMZ (MW197140, Иран) был включен в качестве филогенетической аутгруппы.

Образцы растений томата из Московской области тестировали методом ОТ-ПЦР с праймерами ToBRFV F-5476/ToBRFV R-6287 (Levitzky et al., 2019) и набором реагентов One Tube RT-PCR TaqMan (Евроген, Россия). Каждая реакция объемом 25 мкл содержала 5 мкл мастер микса для ПЦР, 3,5 мкл экстрагированной РНК, по 0,5 мкл каждого праймера, 0,5 мкл ревертазы MMLV и 15 мкл стерильной деионизированной воды. Температурно-временной режим составил: 50 °C – 15 мин, 95 °C – 1 мин, 40 циклов (95 °C – 15 сек, 53 °C – 20 сек, 72 °C – 20 сек).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Праймеры ToBRFV-F/ToBRFV-R (Alkowni et al., 2019), рекомендуемые для специфического выявления ToBRFV в диагностическом протоколе ЕОКЗР (ЕПРО, 2022) и методических рекомендациях ФГБУ «ВНИИКР» (№ 01-2020 МР ВНИИКР), позволяют амплифицировать участок гена репликазы ToBRFV длиной 560 п.о. Использование данных праймеров позволяет эффективно диагностировать целевой объект в образцах растений томата (Shneyder et al., 2022). В качестве примера на рис. 2 представлены результаты одного из тестов по выявлению ToBRFV в образцах растений томата из Ставропольского края.

В ходе секвенирования продуктов амплификации праймеров ToBRFV-F/ToBRFV-R были получены последовательности для 10 изолятов ToBRFV из Ставропольского края, трех изолятов из Волгоградской области, двух изолятов из Московской области, 10 и 5 изолятов из Республики Казахстан и Республики Узбекистан соответственно.

Анализ полученных последовательностей в программе Nucleotide Blast показал, что все они

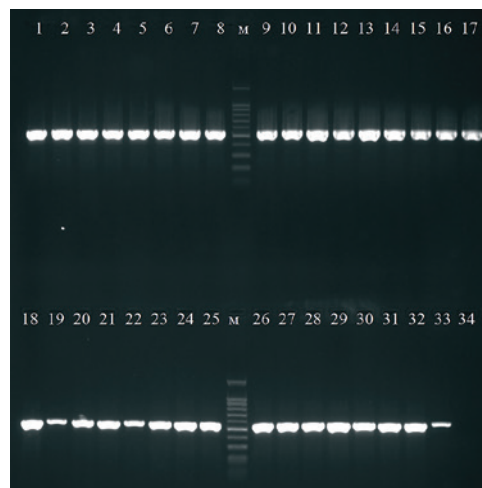


Рис. 2. Выявление вируса коричневой морщинистости плодов томата (ToBRFV) в образцах растений томата из Ставропольского края методом ОТ-ПЦР с праймерами ToBRFV-F/ToBRFV-R (Alkowni et al., 2019). Бэнды 1–33 – образцы растений томата, бэнд 34 – отрицательный контрольный образец

Fig. 2. Detection of ToBRFV in tomato plant samples from Stavropol Krai by RT-PCR with primers ToBRFV-F/ToBRFV-R (Alkowni et al., 2019). Bands 1–33 – tomato plant samples, band 34 – negative control sample

During sequencing of the amplification products of the ToBRFV-F/ToBRFV-R primers, sequences were obtained for 10 ToBRFV isolates from Stavropol Krai, three isolates from Volgograd Oblast, two isolates from Moscow Oblast, 10 and 5 isolates from the Republic of Kazakhstan and the Republic of Uzbekistan, respectively.

Analysis of the obtained sequences in the Nucleotide Blast showed that they all belong to ToBRFV species and correspond to the region of the 126 kDa replicase gene of the ORF-1 ToBRFV of numerous isolates of this virus deposited in the NCBI Genbank.

The identity of nucleotide sequences in the identified isolates from Stavropol Krai (StToBR isolates) compared to the reference ToBRFV isolates ranged from 98.57 to 100%, in isolates from Volgograd Oblast (VolToBR isolates) – from 98.03 to 98.92%, in isolates from Moscow Oblast – from 99.64 to 99.82%.

Among the isolates from Stavropol Krai, the highest identity with the reference ToBRFV isolates (99.82–100%) was demonstrated by isolate StToBR-21-312, while the lowest identity (98.57–98.93%) was demonstrated by isolate StToBR-5-320 (see Tables 1–2), indicating the presence of at least two primary sources of infection. At the same time, in contrast to all other analyzed Russian isolates, isolate StToBR-5-320 demonstrated the highest identity with isolate ToBRFV-SD (OR792460.1) identified in China.

All other isolates from Stavropol Krai, Volgograd Oblast and Moscow Oblast were characterized by high identity with a group of 62–65 reference isolates distributed in Germany, Greece, Israel, Jordan, Iran, China, Morocco, Mexico, the Netherlands, the USA, Palestine and Turkey, of which about 50% were isolates

относятся к виду Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) и соответствуют участку гена репликазы 126 кДа ORC-1 ToBRFV многочисленных изолятов этого вируса, депонированных в генбанке NCBI.

Идентичность последовательностей нуклеотидов у выявленных изолятов из Ставропольского края (изоляты StToBR) в сравнении с референтными изолятами ToBRFV варьировала от 98,57 до 100%, у изолятов из Волгоградской области (изоляты VolToBR) – от 98,03 до 98,92%, у изолятов из Московской области – от 99,64 до 99,82%.

Среди изолятов из Ставропольского края наиболее высокой идентичностью с референтными изолятами ToBRFV (99,82–100%) характеризовался изолят StToBR-21-312, а наименее высокой идентичностью (98,57–98,93%) – изолят StToBR-5-320 (см. табл. 1–2), что свидетельствует о наличии как минимум двух первичных источников инфекции. При этом в отличие от всех других анализируемых российских изолятов для изолята StToBR-5-320 установлена наиболее высокая идентичность с изолятом ToBRFV-SD (OR792460.1), выявленном в Китае.

Все остальные изоляты из Ставропольского края, Волгоградской и Московской областей характеризовались высокой идентичностью с группой из 62–65 референтных изолятов, распространенных в Германии, Греции, Израиле, Иордании, Иране, Китае, Марокко, Мексике, Нидерландах, США, Палестине и Турции, среди которых около 50% составляют изоляты, распространенные в Израиле, Иордании и Турции. Некоторые из этих референтных изолятов и их идентичность по анализируемому участку генома с изолятами ToBRFV из РФ представлены в табл. 2.

Изоляты ToBRFV из Волгоградской области характеризовались менее высокой идентичностью с референтными изолятами этого вируса (не выше 98,93%), чем изоляты из Ставропольского края и Московской области (см. табл. 1), что указывает на различное происхождение первичных источников инфекции.

При попарном сравнении последовательностей нуклеотидов, проведенном с использованием Needleman-Wunsch Global Align Nucleotide Sequences, было установлено, что идентичность изолятов ToBRFV-EK-49 и ToBRFV-EK-54 из Московской области по данному участку генома составляет 100%. Идентичность этих изолятов в сравнении с изолятами из Ставропольского края варьировала от 98,94 до 100%, тогда как с изолятами из Волгоградской области составила всего 97,99–98,73%. Идентичность последовательностей нуклеотидов у изолятов из Волгоградской области в сравнении с изолятами из Ставропольского края варьировала от 97,32 до 98,92%, тогда как внутри группы изолятов из Ставропольского края (за исключением изолята StToBR-5-320) составила 99,09–99,82%. Как уже отмечалось, изолят StToBR-5-320 характеризуется существенной дивергентностью. Его идентичность в сравнении с другими изолятами ToBRFV из Ставропольского края составила всего 97,51–98,75%, а с изолятами из Волгоградской области – 97,33–97,69%. В свою очередь, все три анализируемых изолята ToBRFV из Волгоградской области оказались генетически разнородными.

Табл. 1. Идентичность последовательностей нуклеотидов участка гена репликазы 126 кДа изолятов ToBRFV из Ставропольского края, Волгоградской и Московской областей и изолятов ToBRFV, депонированных в генбанке NCBI

Table 1. Identity of nucleotide sequences of the 126 kDa replicase gene region of ToBRFV isolates from Stavropol Krai, Volgograd Oblast and Moscow Oblast and ToBRFV isolates deposited in the NCBI Genbank

Изолят* Isolate*	Идентичность (%) Identity (%)	Кол-во изолятов из генбанка NCBI с данной идентичностью Number of isolates from NCBI Genbank with given identity
StToBR-3-320 № 1	99,82	62
	99,64	38
StToBR-3-320 № 2	99,11	62
	98,93	38
StToBR-5-320	98,93	1
	98,75	62
	98,57	37
StToBR-11-312 № 1	99,82	62
	99,64	38
StToBR-11-312 № 2	99,28	62
	99,11	38
StToBR-21-312	100	62
	99,82	38
StToBR-24-312 № 1	99,46	62
	99,28	38
StToBR-24-312 № 2	99,82	62
	99,64	38
StToBR-26-312 № 1	99,64	62
	99,46	38
StToBR-26-312 № 2	99,29	62
	99,11	38
VolToBR-42 № 1	98,40	65
	98,22	35
VolToBR-43 № 1	98,92	62
	98,74	38
VolToBR-43 № 2	98,21	62
	98,03	38
ToBRFV-EK-49	99,82	68
	99,64	30
ToBRFV-EK-54	99,82	67
	99,64	31

* Изоляты StToBR, VolToBR и ToBRFV-EK выявлены соответственно в Ставропольском крае, Волгоградской и Московской областях

* Isolates StToBR, VolToBR and ToBRFV-EK were detected in Stavropol Krai, Volgograd Oblast and Moscow Oblast, respectively

Их идентичность в сравнении друг с другом составила всего 97,33–97,69% (см. табл. 3).

Таким образом было показано, что изоляты ToBRFV, выявленные в Ставропольском крае и Московской области, характеризуются высоким генетическим сходством, но существенно отличаются от изолятов этого вируса из Волгоградской области, что может говорить о разном происхождении источника вируса.

Секвенирование продуктов амплификации, полученных в тестах методом ОТ-ПЦР для образцов растений и плодов томата из Республики Казахстан и Республики Узбекистан, подтвердило, что все они относятся к виду Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV). Продукты амплификации праймеров TobRT-up1/TobRT-do2 соответствовали участку гена репликазы 183 кДа OPC-2 ToBRFV, а продукты амплификации праймеров ToBRFV-F/ToBRFV-R – участку гена репликазы 126 кДа OPC-1 ToBRFV многочисленных изолятов этого вируса, депонированных в генбанке NCBI (см. табл. 4–5).

Анализ полученных последовательностей показал, что все изоляты ToBRFV, выявленные в растениях томата из Республики Казахстан, являются

distributed in Israel, Jordan and Turkey. Some of these reference isolates and their identity in the analyzed region of the genome with ToBRFV isolates from the Russian Federation are presented in Table 2.

ToBRFV isolates from Volgograd Oblast were characterized by a lower identity with the reference virus isolates (no higher than 98.93%) than isolates from Stavropol Krai and Moscow Oblast (see Table 1), which indicates a different origin of the primary sources of infection.

Pairwise comparison of nucleotide sequences using Needleman-Wunsch Global Align Nucleotide Sequences showed that the identity of the ToBRFV-EK-49 and ToBRFV-EK-54 isolates from Moscow Oblast for this genomic region was 100%. The identity of these isolates compared to isolates from Stavropol Krai ranged from 98.94 to 100%, while with isolates from Volgograd Oblast it was only 97.99–98.73%. The identity of nucleotide sequences in isolates from Volgograd Oblast compared to isolates from Stavropol Krai ranged from 97.32 to 98.92%, while within the group of isolates from Stavropol Krai (except for isolate StToBR-5-320) it was 99.09–99.82%. As already noted, isolate StToBR-5-320 is characterized

Табл. 2. Сравнение изолятов ToBRFV Волгоградской области и Ставропольского края с референтными изолятами этого вируса по последовательности нуклеотидов в гене репликазы 126 кДа

Table 2. Comparison of ToBRFV isolates from Volgograd Oblast and Stavropol Krai with reference isolates of this virus by the nucleotide sequence in the 126 kDa replicase gene

Российские изоляты ToBRFV* ToBRFV Russian isolates *	Референтные изоляты ToBRFV с наиболее высокой идентичностью последовательности нуклеотидов:										
	TBRFV-Ant-Pe MT118666 Турция Turkey	TBRFV-Ant-Tom MT107885 Турция Turkey	39941596_A MN882048 Нидерланды Netherlands	ToBRFV-Gr MN815773 Греция Greece	F48-PAL MN013188 Палестина Palestine	ToBRFV-SaJO MK648157 Иордания Jordan	TBRFV-P12-3G MK133093 Германия Germany	IR-Rep ON528712 Иран Iran	ToBRFV-HB PP796738 Китай China	A134T PP681638 Израиль Israel	DSMZ PV-1241 MZ202349 Израиль Israel
StToBR-3-320 № 1	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82
StToBR-3-320 № 2	99,11	99,11	99,11	99,11	99,11	99,11	99,11	99,11	99,11	99,11	99,11
StToBR-5-320**	98,75	98,75	98,75	98,75	98,75	98,75	98,75	98,75	98,75	98,75	98,75
StToBR-11-312 № 1	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82
StToBR-11-312 № 2	99,28	99,28	99,28	99,28	99,28	99,28	99,28	99,28	99,28	99,28	99,28
StToBR-21-312	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
StToBR-24-312 № 1	99,46	99,46	99,46	99,46	99,46	99,46	99,46	99,46	99,46	99,46	99,46
StToBR-24-312 № 2	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82
StToBR-26-312 № 1	99,64	99,64	99,64	99,64	99,64	99,64	99,64	99,64	99,64	99,64	99,64
StToBR-26-312 № 2	99,29	99,29	99,29	99,29	99,29	99,29	99,29	99,29	99,29	99,29	99,29
VolToBR-42	98,40	98,40	98,40	98,40	98,40	98,40	98,40	98,40	98,40	98,40	98,40
VolToBR-43 № 1	98,92	98,92	98,92	98,92	98,92	98,92	98,92	98,92	98,92	98,92	98,92
VolToBR-43 № 2	98,21	98,21	98,21	98,21	98,21	98,21	98,21	98,21	98,21	98,21	98,21
ToBRF-EK-54	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82	99,82

* Продукт амплификации ПЦР с праймерами TobRT-up1/TobRT-do2;

** Продукт амплификации ПЦР с праймерами ToBRFV-F/ToBRFV-R

* PCR amplification product with primers TobRT-up1/TobRT-do2;

** PCR amplification product with primers ToBRFV-F/ToBRFV-R

Табл. 3. Идентичность последовательности нуклеотидов (%) участка гена репликазы 126 кДа у российских изолятов ToBRFV из Ставропольского края, Волгоградской и Московской областей

Table 3. Nucleotide sequence identity (%) of the 126 kDa replicase gene region in Russian ToBRFV isolates from Stavropol Krai, Volgograd Oblast and Moscow Oblast

Изоляты	VolToBR-43 № 2	VolToBR-43 № 1	VolToBR-42	StToBR-3-320 № 1	StToBR-3-320 № 2	StToBR-5-320	StToBR-11-312 № 1	StToBR-11-312 № 2	StToBR-21-312	StToBR-24-312 № 1	StToBR-24-312 № 2	StToBR-26-312 № 1	StToBR-26-312 № 2
VolToBR-43 № 2		97,48	97,69	97,63	97,32	97,33	98,04	97,50	98,22	97,68	98,04	97,86	97,34
VolToBR-43 № 1	97,48		97,33	98,55	98,02	97,48	98,74	98,20	98,92	98,38	98,74	98,56	98,04
VolToBR-42 № 1	97,69	97,33		98,36	97,51	97,69	98,22	97,69	98,40	97,86	98,22	98,04	97,87
StToBR-3-320 № 1	97,63	98,53	98,36		99,27	98,54	99,13	99,09	99,82	99,27	99,63	99,45	99,09
StToBR-5-320	97,33	97,48	97,69	98,54	97,68		98,39	97,51	98,39	98,04	98,75	98,21	97,69
StToBR-11-312 № 1	98,04	98,74	98,22	99,63	99,28	98,39		99,11	99,64	99,64	99,64	99,46	99,47
StToBR-21-312	98,22	98,92	98,40	99,82	99,11	98,39	99,64	99,28		99,46	99,82	99,64	99,11
StToBR-24-312 № 1	97,68	98,38	97,86	99,27	98,04	98,04	99,64	98,76	99,46		99,64	99,11	99,11
StToBR-26-312 № 1	97,86	98,56	98,04	99,45	98,75	98,21	99,46	98,93	99,64	99,11	99,46		98,76
ToBRFV-EK-49, ToBFV-EK-54	97,99	98,73	98,36	100	99,27	98,94	99,63	99,09	99,82	99,27	99,63	99,45	99,09

генетически близкородственными. Идентичность последовательности нуклеотидов в гене полимеразы 126 кДа изолята Kaz-21 и изолятов Kaz-20, Kaz-22, Kaz-26, Kaz-27, Kaz-30 и Kaz-31 составила 100%, а изолята Kaz-21 в сравнении с изолятами Kaz-23, Kaz-24 и Kaz-25 – 99,81%, то есть отличалась всего по одному нуклеотиду.

Последовательность нуклеотидов гена репликазы 126 кДа OPC-1 у выявленных изолятов Kaz-20, Kaz-21, Kaz-22, Kaz-26, Kaz-27 и Kaz-30 на 100% соответствовала таковой у 57–58 изолятов ToBRFV из генбанка NCBI. Для изолятов Kaz-23, Kaz-24, Kaz-25 и Kaz-31 идентичность данного участка в сравнении с этими же референтными изолятами ToBRFV составила 99,64–99,82% (см. табл. 4). Более 50% референтных изолятов этой группы было выявлено в Нидерландах.

По последовательности нуклеотидов в гене репликазы 183 кДа изоляты Kaz-20, Kaz-22, Kaz-23, Kaz-24, Kaz-25 и Kaz-26 из Республики Казахстан характеризуются наиболее высокой идентичностью (99,29–99,82%) с изолятом 39986411 (OM515247) из Нидерландов. С группой из 101 другого референтного изолята ToBRFV по этому участку генома идентичность изолятов из Республики Казахстан составила 99,11–99,64% (см. табл. 4). Эта группа включает 55 других изолятов из Нидерландов и референтный изолят Uzb_4.1 (OR501605) из Узбекистана. Идентичность последовательностей нуклеотидов у шести выявленных изолятов ToBRFV из Узбекистана в сравнении с референтными изолятами этого вируса составила 99,27–99,82% для гена репликазы 183 кДа OPC-2 и 99,82–100% – для гена репликазы 126 кДа OPC-1 (см. табл. 5). Для изолята Uzb-6 наблюдалась 100%-я идентичность участка гена репликазы 126 кДа с изолятом ConV-01 (OR150933) из Италии. Идентичность выявленных нами изолятов Uzb-1 и Uzb-3 по участку гена

by significant divergence. Its identity in comparison with other ToBRFV isolates from Stavropol Krai was only 97.51–98.75%, and with isolates from Volgograd Oblast – 97.33–97.69%. In turn, all three analyzed ToBRFV isolates from Volgograd Oblast turned out to be genetically heterogeneous. Their identity in comparison with each other was only 97.33–97.69% (see Table 3).

Thus, it was shown that ToBRFV isolates identified in Stavropol Krai and Moscow Oblast are characterized by high genetic similarity, but differ significantly from this virus isolates from the Volgograd Oblast, which may indicate a different origin of the virus source.

Sequencing of the amplification products obtained in RT-PCR tests for tomato plant and fruit samples from the Republic of Kazakhstan and the Republic of Uzbekistan confirmed that they all belong to the ToBRFV. The amplification products of the TobRT-up1/TobRT-do2 primers corresponded to the 183 kDa replicase gene region of the ToBRFV ORF-2, and the amplification products of the ToBRFV-F/ToBRFV-R primers corresponded to the 126 kDa replicase gene region of the ToBRFV ORF-1 of numerous isolates of this virus deposited in the NCBI Genbank (see Tables 4–5).

Analysis of the obtained sequences showed that all ToBRFV isolates detected in tomato plants from the Republic of Kazakhstan are genetically closely related. The identity of the nucleotide sequence in the 126 kDa polymerase gene of the isolate Kaz-21 and isolates Kaz-20, Kaz-22, Kaz-26, Kaz-27, Kaz-30 and Kaz-31 was 100%, and that of the isolate Kaz-21 compared to isolates Kaz-23, Kaz-24 and Kaz-25 was 99.81%, i.e. it differed in only one nucleotide.

Табл. 4. Идентичность последовательностей нуклеотидов изолятов ToBRFV из Республики Казахстан и изолятов ToBRFV, депонированных в генбанке NCBI

Table 4. Identity of ToBRFV isolates nucleotide sequences from the Republic of Kazakhstan and ToBRFV isolates deposited in the NCBI Genbank

Изолят Isolate	Участок генома Genome region	Идентичность (%) Identity (%)	Кол-во изолятов NCBI*** Number of isolates NCBI***
Kaz-20	Ген репликазы 183 кДа ORF-2*	99,46	1
	Replicase gene 183 kDa ORF-2*	99,28	101
	Ген репликазы 126 кДа ORF-1**	100	57
	Replicase gene 126 kDa ORF-1**	99,82	42
Kaz-21	Ген репликазы 126 кДа ORF-1**	100	57
	Replicase gene 126 kDa ORF-1**	99,82	42
Kaz-22	Ген репликазы 183 кДа ORF-2*	99,29	1
	Replicase gene 183 kDa ORF-2*	99,11	101
	Ген репликазы 126 кДа ORF-1**	100	57
	Replicase gene 126 kDa ORF-1**	99,82	42
Kaz-23	Ген репликазы 183 кДа ORF-2*	99,46	1
	Replicase gene 183 kDa ORF-2*	99,28	101
	Ген репликазы 126 кДа ORF-1**	99,82	57
	Replicase gene 126 kDa ORF-1**	99,64	42
Kaz-24	Ген репликазы 183 кДа ORF-2*	99,64	1
	Replicase gene 183 kDa ORF-2*	99,45	101
	Ген репликазы 126 кДа ORF-1**	99,82	57
	Replicase gene 126 kDa ORF-1**	99,64	42
Kaz-25	Ген репликазы 183 кДа ORF-2*	99,64	1
	Replicase gene 183 kDa ORF-2*	99,46	101
	Ген репликазы 126 кДа ORF-1**	99,82	57
	Replicase gene 126 kDa ORF-1**	99,64	42
Kaz-26	Ген репликазы 183 кДа ORF-2*	99,82	1
	Replicase gene 183 kDa ORF-2*	99,64	101
	Ген репликазы 126 кДа ORF-1**	100	57
	Replicase gene 126 kDa ORF-1**	99,82	42
Kaz-27	Ген репликазы 126 кДа ORF-1**	100	58
	Replicase gene 126 kDa ORF-1**	99,82	41
Kaz-30	Ген репликазы 126 кДа ORF-1**	100	58
	Replicase gene 126 kDa ORF-1**	99,82	41
Kaz-31	Ген репликазы 126 кДа ORF-1**	99,82	57
	Replicase gene 126 kDa ORF-1**	99,64	42

* Продукт амплификации ПЦР с праймерами TobRT-up1/TobRT-do2;

** Продукт амплификации ПЦР с праймерами ToBRFV-F/ToBRFV-R;

*** Количество изолятов в генбанке NCBI с данной идентичностью

* PCR amplification product with primers TobRT-up1/TobRT-do2;

** PCR amplification product with primers ToBRFV-F/ToBRFV-R;

*** Number of isolates in the NCBI Genbank with a given identity

репликазы 183 кДа в сравнении с аналогичным участком генома референтного изолята Uzb_4.1 (OR501605) оказалась высокой и составила соответственно 99,29 и 99,82%.

После попарных сравнений участка гена репликазы 126 кДа идентичность изолятов Uzb-1, Uzb-2, Uzb-3 и Uzb-4 составила 100%, а идентичность изолята Uzb-6 в сравнении с этими изолятами – 99,82%.

The nucleotide sequence of the 126 kDa ORF-1 replicase gene in the identified isolates Kaz-20, Kaz-21, Kaz-22, Kaz-26, Kaz-27 and Kaz-30 was 100% consistent with that of 57–58 ToBRFV isolates from the NCBI Genbank. For isolates Kaz-23, Kaz-24, Kaz-25 and Kaz-31, the identity of this region compared to the same reference ToBRFV isolates was 99.64–99.82% (see Table 4). More than 50% of the reference isolates of this group were identified in the Netherlands.

Based on the nucleotide sequence in the 183 kDa replicase gene, isolates Kaz-20, Kaz-22, Kaz-23, Kaz-24, Kaz-25, and Kaz-26 from the Republic of Kazakhstan are characterized by the highest identity (99.29–99.82%) with isolate 39986411 (OM515247) from the Netherlands. With a group of 101 other reference ToBRFV isolates, the identity of the isolates from the Republic of Kazakhstan for this region of the genome was 99.11–99.64% (see Table 4). This group includes 55 other isolates from the Netherlands and the reference isolate Uzb_4.1 (OR501605) from Uzbekistan. The identity of nucleotide sequences in six identified ToBRFV isolates from Uzbekistan compared to the reference isolates of this virus was 99.27–99.82% for the 183 kDa replicase gene ORF-2 and 99.82–100% for the 126 kDa replicase gene ORF-1 (see Table 5). For the Uzb-6 isolate, 100% identity of the 126 kDa replicase gene region was observed with the Conv-01 (OP150933) isolate from Italy. The identity of the Uzb-1 and Uzb-3 isolates identified by us for the 183 kDa replicase gene region compared to the same region of the genome of the reference isolate Uzb_4.1 (OR501605) was high and amounted to 99.29 and 99.82%, respectively.

After pairwise comparisons of the 126 kDa replicase gene region, the identity of isolates Uzb-1, Uzb-2, Uzb-3 and Uzb-4 was 100%, and the identity of isolate Uzb-6 compared to these isolates was 99.82%.

According to the conducted phylogenetic analysis, it was established that isolates StToBR-26-312-1, StToBR-26-312-2, StToBR-21-312 (Stavropol Krai), Kaz-26 and Kaz-31 (Re-

public of Kazakhstan) form a separate cluster together with isolates TBRFV-IL (Israel) and Tom2M-Jo (Jordan). Isolates Kaz-22, Kaz-23, Kaz-24 and Kaz-30 (Republic of Kazakhstan) and Uzb-1 (Republic of Uzbekistan)

Табл. 5. Идентичность последовательностей нуклеотидов изолятов ToBRFV из Республики Узбекистан и изолятов ToBRFV, депонированных в генбанке NCBI

Table 5. Identity of ToBRFV isolates nucleotide sequences from the Republic of Uzbekistan and ToBRFV isolates deposited in the NCBI Genbank

Изолят Isolate	Участок генома Genome region	Идентичность (%) Identity (%)	Кол-во изолятов NCBI*** Number of isolates NCBI***
Uzb-1	Ген репликазы 183 кДа OPC-2* Replicase gene 183 kDa ORF-2*	99,29	102
	Ген репликазы 126 кДа OPC-1** Replicase gene 126 kDa ORF-1**	100	57
	Ген репликазы 126 кДа OPC-1** Replicase gene 126 kDa ORF-1**	99,82	42
Uzb-2	Ген репликазы 183 кДа OPC-2* Replicase gene 183 kDa ORF-2*	99,27	102
	Ген репликазы 126 кДа OPC-1** Replicase gene 126 kDa ORF-1**	100	99
	Ген репликазы 126 кДа OPC-1** Replicase gene 126 kDa ORF-1**	99,82	41
Uzb-3	Ген репликазы 183 кДа OPC-2* Replicase gene 183 kDa ORF-2*	99,82	102
	Ген репликазы 126 кДа OPC-1** Replicase gene 126 kDa ORF-1**	100	58
	Ген репликазы 126 кДа OPC-1** Replicase gene 126 kDa ORF-1**	99,82	41
Uzb-4	Ген репликазы 126 кДа OPC-1** Replicase gene 126 kDa ORF-1**	100	58
	Ген репликазы 126 кДа OPC-1** Replicase gene 126 kDa ORF-1**	99,82	42
	Ген репликазы 126 кДа OPC-1** Replicase gene 126 kDa ORF-1**	99,64	41
Uzb-6	Ген репликазы 126 кДа OPC-1** Replicase gene 126 kDa ORF-1**	100	1
	Ген репликазы 126 кДа OPC-1** Replicase gene 126 kDa ORF-1**	99,82	58
	Ген репликазы 126 кДа OPC-1** Replicase gene 126 kDa ORF-1**	99,64	41

* Продукт амплификации ПЦР с праймерами TobRT-up1/TobRT-do2;

** Продукт амплификации ПЦР с праймерами ToBRFV-F/ToBRFV-R;

*** Количество изолятов в генбанке NCBI с данной идентичностью

* PCR amplification product with primers TobRT-up1/TobRT-do2;

** PCR amplification product with primers ToBRFV-F/ToBRFV-R;

*** Number of isolates in the NCBI Genbank with a given identity

Согласно проведенному филогенетическому анализу установлено, что изоляты StToBR-26-312-1, StToBR-26-312-2, StToBR-21-312 (Ставропольский край), Kaz-26 и Kaz-31 (Республика Казахстан) образуют отдельный кластер совместно с изолятами TBRFV-IL (Израиль) и Tom2M-Jo (Иордания). Изоляты Kaz-22, Kaz-23, Kaz-24 и Kaz-30 (Республика Казахстан) и Uzb-1 (Республика Узбекистан) формировали второй кластер совместно с изолятами TBRFV-Ant-Tom (Турция) и ToBRFV-SD (Китай). Изоляты Kaz-21, Kaz-25 и Kaz-27 (Республика Казахстан) группировались совместно с изолятом 39941596_A (Нидерланды). Изоляты из Московской области (ToBRFV-EK-49 и ToBRFV-EK-54) и четыре изолята из Ставропольского края (StToBR-3-320-1, StToBR-3-320-2, StToBR-11-312-1 и StToBR-26-312-2) образуют отдельную филогенетическую подгруппу. Изоляты из Волгоградской области (VolToBR-42, VolToBR-43-1 и VolToBR-43-2) совместно с изолятом StToBR-5-320 также формируют отдельный кластер (см. рис. 3).

Секвенирование продуктов амплификации праймеров ToBRFV F-5476/ToBRFV R-6287 (Levitzky et al., 2019) позволило также получить полноразмерные последовательности нуклеотидов гена белка оболочки длиной 486 нуклеотидов для двух других изолятов ToBRFV (ToBRFV-LO-43 и ToBRFV-LO-44), выявленных в Московской области. Полученные последовательности соответствовали

formed the second cluster together with isolates TBRFV-Ant-Tom (Turkey) and ToBRFV-SD (China). Isolates Kaz-21, Kaz-25 and Kaz-27 (Republic of Kazakhstan) were grouped together with isolate 39941596_A (Netherlands). Isolates from Moscow Oblast (ToBRFV-EK-49 and ToBRFV-EK-54) and four isolates from Stavropol Krai (StToBR-3-320-1, StToBR-3-320-2, StToBR-11-312-1 and StToBR-26-312-2) form a separate phylogenetic subgroup. Isolates from Volgograd Oblast (VolToBR-42, VolToBR-43-1 and VolToBR-43-2) together with isolate StToBR-5-320 also form a separate cluster (see Fig. 3).

Sequencing of the amplification products of the ToBRFV F-5476/ToBRFV R-6287 primers (Levitzky et al., 2019) also allowed us to obtain full-length nucleotide sequences of the coat protein gene (486 nucleotides) for two other ToBRFV isolates (ToBRFV-LO-43 and ToBRFV-LO-44) identified in Moscow Oblast. The obtained sequences corresponded to a similar region of the genome of the general group of 117 ToBRFV isolates deposited in the NCBI Genbank, among which isolates common in the Netherlands predominated. The identity of the nucleotide sequences of the coat protein gene of the ToBRFV-LO-43 and ToBRFV-LO-44 isolates compared to the reference isolates of this virus was 98.36 and 99.38%, respectively. The identity between isolates ToBRFV-LO-43 and ToBRFV-LO-44 was only 97.33%.

CONSLUSION

The conducted studies allow us to conclude that the ToBRFV isolates that have spread in the Russian Federation are quite genetically heterogeneous, which indicates repeated cases of this virus being introduced in the Russian Federation from various sources. Two groups of ToBRFV isolates were detected in Moscow Oblast, one of which is genetically closely related to the isolates of this virus that are common in Stavropol Krai. In turn, most ToBRFV isolates from Volgograd Oblast differ significantly in the nucleotide sequence in the 126 kDa replicase gene from isolates from Stavropol Krai and Moscow Oblast. It was established that the ToBRFV isolates common in the Republic of Kazakhstan have a high genetic similarity to the isolates of this virus that were identified in the Netherlands and form a phylogenetic cluster with three isolates from Stavropol Krai. For the Uzb-6 isolate from the Republic of Uzbekistan, 100% identity of the 126 kDa replicase gene region was established with the Conv-01 (OP150933) isolate from Italy.

аналогичному участку генома общей группы из 117 изолятов ToBRFV, депонированных в генбанке NCBI, среди которых преобладали изоляты, распространенные в Нидерландах. Идентичность последовательностей нуклеотидов гена белка оболочки изолятов ToBRFV-LO-43 и ToBRFV-LO-44 в сравнении с референтными изолятами этого вируса составила соответственно 98,36 и 99,38%. Идентичность между изолятами ToBRFV-LO-43 и ToBRFV-LO-44 составила всего 97,33%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволяют сделать вывод о достаточно высокой генетической разнородности изолятов ToBRFV, получивших распространение в Российской Федерации, что свидетельствует о неоднократных случаях проникновения этого вируса в нашу страну из различных источников. В Московской области выявлены две группы изолятов ToBRFV, одна из которых генетически близкородственна изолятам этого вируса, распространенным в Ставропольском крае. В свою очередь, большинство изолятов ToBRFV из Волгоградской области существенно отличаются по последовательности нуклеотидов в гене репликазы 126 кДа от изолятов из Ставропольского края и Московской области. Установлено, что изоляты ToBRFV, распространенные в Республике Казахстан, имеют высокое генетическое сходство с изолятами этого вируса, выявленными в Нидерландах, и формируют филогенетический кластер с тремя изолятами из Ставропольского края. Для изолята Uzb-6 из Республики Узбекистан установлена 100%-я идентичность участка гена репликазы 126 кДа с изолятом Conv-01 (OP150933) из Италии.

Благодарность.

Авторы выражают благодарность заведующей лабораторией вирусологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР» Н. К. Шилкиной за предоставление материала зараженных плодов томата из Республики Узбекистан.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каримова Е.В., Шнейдер Ю.А. Вирус коричневой морщинистости плодов томата – потенциальная угроза для производства томатов и перца. *Фитосанитария. Карантин растений*. 2020а;(3):6-16. <https://doi.org/10.69536/FKR.2020.97.40.001>.
2. Каримова Е.В., Шнейдер Ю.А. Вирус коричневой морщинистости плодов томата - потенциально опасный патоген для Российской Федерации и других стран ЕАЭС. *Защита и карантин растений*. 2020b. № 9. С. 38–41.
3. Лозовая Е.Н., Приходько Ю.Н., Живаева Т.С., Шнейдер Ю.А., Каримова Е.В. Диагностика вирусов

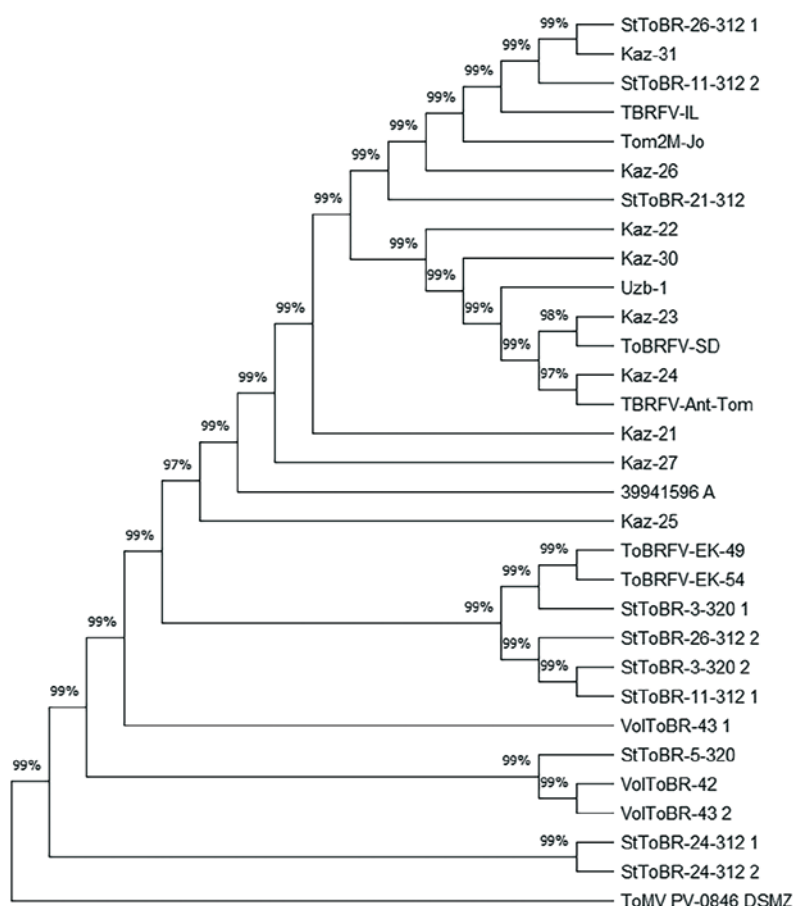


Рис. 3. Филогенетический анализ изолятов ToBRFV, распространенных в Российской Федерации, Республике Казахстан, Республике Узбекистан, и ряда референтных изолятов ToBRFV по последовательности участка гена репликазы 126 кДа

Fig. 3. Phylogenetic analysis of ToBRFV isolates distributed in the Russian Federation, the Republic of Kazakhstan, the Republic of Uzbekistan, and some reference ToBRFV isolates by the nucleotide sequence of the 126 kDa replicase gene region

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the head of the Virology Laboratory of the Testing Laboratory Center of FGBU “VNIICR” N.K. Shilkina for providing the material of infected tomato fruits from the Republic of Uzbekistan.

REFERENCES

1. Karimova E.V., Shneyder Y.A. Tomato brown rugose fruit virus is a potential threat for the tomato and pepper industry. *Plant Health and Quarantine*. 2020a;(3):6-16. <https://doi.org/10.69536/FKR.2020.97.40.001>
2. Karimova E.V., Shneyder Y.A. Tomato brown rugose fruit virus is a potential pathogen for the Russian Federation and other EAEU countries. *Plant Health and Quarantine*. 2020b; (9): 38–41.
3. Lozovaya E.N., Prikhodko Yu.N., Zhivaeva T.S., Shneyder Yu.A., Karimova E.V. Diagnosis of Tobamovirus genus viruses infecting Solanaceae. *Plant Health and Quarantine*. 2022;(2):39-49. <https://doi.org/10.69536/p4517-2518-6750-w>.

рода Tobamovirus, заражающих пасленовые овощные культуры. Фитосанитария. Карантин растений. 2022;(2):39-49. <https://doi.org/10.69536/p4517-2518-6750-w>.

4. МСФМ 32, Международные стандарты по фитосанитарным мерам №32 «Категоризация товаров в соответствии с представляемым ими фитосанитарным риском», 2009 г., 19 с.

5. Национальный доклад о карантинном фитосанитарном состоянии территории Российской Федерации в 2023 году. Фитосанитария. Карантин растений. 2024;(2):2-16.

6. Национальный доклад о карантинном фитосанитарном состоянии территории Российской Федерации в 2024 году. Фитосанитария. Карантин растений. 2025;(2). (в печати).

7. 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.

8. Alkowni R., Alabdallah O., Fadda Z. Molecular identification of Tomato brown rugose fruit virus in tomato in Palestine// Journal of Plant Pathology. 2019. Vol. 101(3). P.719-723. DOI:10.1007/s42161-019-00240-7.

9. Davino S., Caruso A.G., Bertacca S., Barone S., Panno S. Tomato brown rugose fruit virus: seed transmission rate and efficacy of different seed disinfection treatments// Plants. 2020. 9(11):1615. <https://doi.org/10.3390/plants9111615>.

10. Dovas C.I., Efthimiou K., Katis N.I. Generic detection and differentiation of tobamoviruses by a spot nested RT-PCR-RFLP using dI-containing primers along with homologous dG-containing primers// Journal of Virological Methods. 2004. Vol.117. P.137–144. DOI: 10.1016/j.jviromet.2004.01.004.

11. EPPO, 2022. PM 7/146(2) Tomato brown rugose fruit virus/ EPPO Standard on Diagnostics// EPPO Bulletin. 2022. Vol. 52. P. 665–692.

12. EPPO, 2025. *Tobamovirus fructirugosum*. EPPO datasheets on pests recommended for regulation. <https://gd.eppo.int> (accessed 2025-01-28).

13. Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

14. Levitzky N., Smith E., Lachman O., Luria N., Mizrahi Y., Bakelman H., Sela N., Laskar O., Milrot E., Dombrovsky A. The bumblebee *Bombus terrestris* carries a primary inoculum of Tomato brown rugose fruit virus contributing to disease spread in tomatoes// PLoS ONE. 2019. Vol. 14(1): e0210871. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210871>.

15. Luria N., Smith E., Reingold V., Bekelman I., Lapidot M. A new Israeli Tobamovirus isolate infects tomato plants harboring Tm-22 resistance genes// PLOS ONE. 2017. 12(1): e0170429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170429>.

16. Panno S., Caruso A.G., Barone S., Lo Bosco G., Rangel E.A., Davino S. Spread of Tomato brown rugose fruit virus in Sicily and evaluation of the spatiotemporal dispersion in experimental conditions// Agronomy. 2020. 10(6):834. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060834>.

17. Salem N., Mansour A., Ciuffo M., Falk B.W., Turina M. A new tobamovirus infecting tomato crops

4. ISPM 32, International Standards for Phytosanitary Measures No. 32 “Categorization of Commodities According to Pest Risk”, 2009, 19 p.

5. The National Report on Quarantine and Phytosanitary Status of the Territory of the Russian Federation in 2023. *Plant Health and Quarantine*. 2024; (2):2-16.

6. The National Report on Quarantine and Phytosanitary Status of the Territory of the Russian Federation in 2023. *Plant Health and Quarantine*. 2025;(2). (in press).

7. Shneyder Yu.A., Karimova E.V., Prihodko Yu.N., Lozovaya E.N., Zhivaeva T.S. Tomato viruses especially dangerous for vegetable growing of Russia. *Potato and vegetables*. 2021; (6): 3–8. (In Russ.)

8. Alkowni R., Alabdallah O., Fadda Z. Molecular identification of Tomato brown rugose fruit virus in tomato in Palestine// Journal of Plant Pathology. 2019. Vol. 101(3). P.719-723. DOI:10.1007/s42161-019-00240-7.

9. Davino S., Caruso A.G., Bertacca S., Barone S., Panno S. Tomato brown rugose fruit virus: seed transmission rate and efficacy of different seed disinfection treatments// Plants. 2020. 9(11):1615. <https://doi.org/10.3390/plants9111615>.

10. Dovas C.I., Efthimiou K., Katis N.I. Generic detection and differentiation of tobamoviruses by a spot nested RT-PCR-RFLP using dI-containing primers along with homologous dG-containing primers// Journal of Virological Methods. 2004. Vol.117. P.137–144. DOI: 10.1016/j.jviromet.2004.01.004.

11. EPPO, 2022. PM 7/146(2) Tomato brown rugose fruit virus/ EPPO Standard on Diagnostics// EPPO Bulletin. 2022. Vol. 52. P. 665–692.

12. EPPO, 2025. *Tobamovirus fructirugosum*. EPPO datasheets on pests recommended for regulation. <https://gd.eppo.int> (accessed 2025-01-28).

13. Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

14. Levitzky N., Smith E., Lachman O., Luria N., Mizrahi Y., Bakelman H., Sela N., Laskar O., Milrot E., Dombrovsky A. The bumblebee *Bombus terrestris* carries a primary inoculum of Tomato brown rugose fruit virus contributing to disease spread in tomatoes// PLoS ONE. 2019. Vol. 14(1): e0210871. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210871>.

15. Luria N., Smith E., Reingold V., Bekelman I., Lapidot M. A new Israeli Tobamovirus isolate infects tomato plants harboring Tm-22 resistance genes// PLOS ONE. 2017. 12(1): e0170429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170429>.

16. Panno S., Caruso A.G., Barone S., Lo Bosco G., Rangel E.A., Davino S. Spread of Tomato brown rugose fruit virus in Sicily and evaluation of the spatiotemporal dispersion in experimental conditions// Agronomy. 2020. 10(6):834. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060834>.

17. Salem N., Mansour A., Ciuffo M., Falk B.W., Turina M. A new tobamovirus infecting tomato crops

in Jordan// Archives of Virology. 2016. Vol.161 (2). P. 503–506. DOI: 10.1007/s00705-015-2677-7.

18. Salem N.M., Jewehan A., Aranda M.A., Fox A. Tomato Brown Rugose Fruit Virus Pandemic// Annu. Rev. Phytopathol. 2023. Vol.61. P.137-164. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-021622-120703>.

19. Salem N.M., Sulaiman A., Samarah N., Turina M., Vallino M. Localization and mechanical transmission of Tomato brown rugose fruit virus in tomato seeds// Plant Disease. 2022. Vol.106 (1). P.275-281. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-20-2413-RE>.

20. Shneyder Y., Karimova E., Zhivaeva T., Lozovaya E., Bashkirova I., Prikhodko Y. Comparison of express-diagnostic kit and PCR tests for detection of Tomato brown rugose fruit virus Acta Horticulturae. 2022. T. 1351. C. 113–118.

21. Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38:3022–3027.

22. <https://fsvps.gov.ru/files/otkrytie-dannye-perechen-karantinnyh-fitosanitarnyh-zon-skachat-nabor-v-csv-i-v-xlsx/> (дата обращения: 09.01.2025 г.)

23. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=GlobalAln (дата обращения: 10.01.2025 г.)

24. <https://ncbiinsights.ncbi.nlm.nih.gov/2021/07/09/blast-2-12-0/> (дата обращения: 15.01.2025 г.).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Лозовая Евгения Николаевна, научный сотрудник отдела аспирантуры ФГБУ «ВНИИР», р. п. Быково, г. о. Раменский, Московская обл., Россия, 140150; e-mail: evgeniyaf@mail.ru

Живаева Татьяна Степановна, научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии ФГБУ «ВНИИР», р. п. Быково, г. о. Раменский, Московская обл., Россия, 140150; e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru

Приходько Юрий Николаевич, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии ФГБУ «ВНИИР», 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 «ВНИИР», р. п. Быково, г. о. Раменский, Московская обл., Россия, 140150; ORCID 0000-0002-7565-1241, e-mail: yury.shneyder@mail.ru

Башкирова Ида Геннадьевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии ФГБУ «ВНИИР», р. п. Быково, г. о. Раменский, Московская обл., Россия, 140150; ORCID ID 0000-0001-9014-4179, e-mail: bashkirovaid@mail.ru

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

in Jordan// Archives of Virology. 2016. Vol.161 (2). P. 503–506. DOI: 10.1007/s00705-015-2677-7.

18. Salem N.M., Jewehan A., Aranda M.A., Fox A. Tomato Brown Rugose Fruit Virus Pandemic// Annu. Rev. Phytopathol. 2023. Vol.61. P.137-164. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-021622-120703>.

19. Salem N.M., Sulaiman A., Samarah N., Turina M., Vallino M. Localization and mechanical transmission of Tomato brown rugose fruit virus in tomato seeds// Plant Disease. 2022. Vol.106 (1). P. 275-281. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-20-2413-RE>.

20. Shneyder Y., Karimova E., Zhivaeva T., Lozovaya E., Bashkirova I., Prikhodko Y. Comparison of express-diagnostic kit and PCR tests for detection of Tomato brown rugose fruit virus Acta Horticulturae. 2022. T. 1351. C. 113–118.

21. Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38:3022–3027.

22. <https://fsvps.gov.ru/files/otkrytie-dannye-perechen-karantinnyh-fitosanitarnyh-zon-skachat-nabor-v-csv-i-v-xlsx/> (last accessed: 09.01.2025 г.)

23. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=GlobalAln (last accessed: 10.01.2025 г.)

24. <https://ncbiinsights.ncbi.nlm.nih.gov/2021/07/09/blast-2-12-0/> (last accessed: 15.01.2025 г.).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Evgeniya Lozovaya, Researcher, Postgraduate Department, FGBU “VNIIR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia, 140150; e-mail: evgeniyaf@mail.ru

Tatiana Zhivaeva, Researcher, Research and Methodology Department of Virology FGBU “VNIIR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia, 140150; e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru

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

Yuri Shneyder, PhD in Biology, Leading Researcher, Head of Research and Methodology Department of Virology, FGBU “VNIIR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia, 140150; ORCID 0000-0002-7565-1241, e-mail: yury.shneyder@mail.ru

Ida Bashkirova, PhD in Biology, Researcher, Research and Methodology Department of Virology, FGBU “VNIIR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia, 140150; ORCID ID 0000-0001-9014-4179, e-mail: bashkirovaid@mail.ru

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