

согласно литературным данным, позволяет отличить *M. laxa* от *M. fructicola*, но не другие виды.

Важной остается проблема латентной инфекции в плодах и посадочном материале. В настоящий момент ведутся разработки новых методов выявления и идентификации патогенов, основанные на выделении ДНК гриба из растения-хозяина и последующей постановке ПЦР в реальном времени.

ЛИТЕРАТУРА

- Афанасьев М.В., Миронова Л.В., Балахонов С.В. MALDI-ToF масс-спектрометрический анализ для идентификации возбудителей чумы, холеры и туляремии // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2015. – № 2. – С. 3–8. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/maldi-tof-mass-spektrometricheskij-analiz-dlya-identifikatsii-vozbuditeley-chumy-holery-i-tulyaremii/viewer>.
- Дудченко И.П., Копина М.Б. Методические рекомендации по выявлению и идентификации возбудителя бурой монилиозной гнили *Monilinia fructicola* (Winter) Honey. – М.: ФГБУ «ВНИИКР», 2017. – 52 с.
- Côté M.J., Tardif M.C., Meldrum A.J. Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR // Plant Disease. – 2004. – Vol. 88, No. 11. – P. 1219–1225.
- Freimoser F.M. et al. Direct identification of *Monilinia* brown rot fungi on infected fruits by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry // Chemical and Biological Technologies in Agriculture. – 2016. – Vol. 3, No. 1. – P. 7.
- Garcia-Benitez C., Melgarejo P. et al. Proficiency of real-time PCR detection of latent *Monilinia* spp. infection in nectarine flowers and fruit // Phytopathologia Mediterranea. – 2017a. – Vol. 56, No. 2. – P. 242–250.
- Garcia-Benitez C., Melgarejo P. et al. Detection of latent *Monilinia* infections in nectarine flowers and fruit by qPCR // Plant Disease. – 2017b. – No. 101. – P. 1002–1008.
- Guinet C. et al. One-step detection of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena*, and *M. laxa* on *Prunus* and *Malus* by a Multiplex Real-Time PCR assay // Plant Disease. – 2016. – Vol. 100, No. 12. – P. 2465–2474.
- Hrustić J. et al. Genus *Monilinia* on pome and stone fruit species // Pesticidi i fitomedicina. – 2012. – Vol. 27, No. 4. – P. 283–297.
- Ioos R., Frey P. Genomic variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR // European Journal of Plant Pathology. – 2000. – Vol. 106, No. 4. – P. 373–378.
- Lane C.R. A synoptic key for differentiation of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena* and *M. laxa*, based on examination of cultural characters // EPPO Bulletin. – 2002. – Vol. 32, No. 3. – P. 489–493.
- Michailides T.J., Morgan D.P. et al. Detection and significance of symptomless latent infection of *Monilinia fructicola* in California stone fruit (abstr.) // Phytopathology. – 2000. – No. 90. – P. 48.
- Van Brouwershaven I.R. et al. A real-time (TaqMan) PCR assay to differentiate *Monilinia fructicola* from other brown rot fungi of fruit crops // Plant Pathology. – 2010. – Vol. 59, No. 3. – P. 548–555.
- White T.J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR protocols: a guide to methods and applications. – 1990. – Vol. 18, No. 1. – P. 315–322.

developed based on the extraction of the fungal DNA from the host plant and subsequent qPCR.

REFERENCES

- Afanasev M.V., Mironova L.V., Balakhonov S.V. MALDI-ToF mass spectrometric analysis for identification of plague, cholera and tularaemia pathogens [MALDI-ToF mass-spektrometricheskij analiz dlya identifikatsii vozbuditelej chumy, holery i tulyaremii]. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2015; 2: 3–8. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/maldi-tof-mass-spektrometricheskij-analiz-dlya-identifikatsii-vozbuditeley-chumy-holery-i-tulyaremii/viewer> (in Russian).
- Dudchenko I.P., Kopina M.B. Methodological recommendations for the detection and identification of brown *Monilinia fructicola* (Winter) Honey brown rot [Metodicheskie rekomendacii po vyavleniyu i identifikatsii vozbuditelya buroj monilioznoj gnili *Monilinia fructicola* (Winter) Honey]. М.: FGBU “VNIIKR”, 2017 (in Russian).
- Côté M.J., Tardif M.C., Meldrum A.J. Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. *Plant Disease*. 2004; 88 (11): 1219–1225.
- Freimoser F.M. et al. Direct identification of *Monilinia* brown rot fungi on infected fruits by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2016; 3 (1): 7.
- Garcia-Benitez C., Melgarejo P. et al. Proficiency of real-time PCR detection of latent *Monilinia* spp. infection in nectarine flowers and fruit. *Phytopathologia Mediterranea*. 2017a; 56 (2): 242–250.
- Garcia-Benitez C., Melgarejo P. et al. Detection of latent *Monilinia* infections in nectarine flowers and fruit by qPCR. *Plant Disease*. 2017b; 101: 1002–1008.
- Guinet C. et al. One-step detection of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena*, and *M. laxa* on *Prunus* and *Malus* by a Multiplex Real-Time PCR assay. *Plant Disease*. 2016; 100 (12): 2465–2474.
- Hrustić J. et al. Genus *Monilinia* on pome and stone fruit species. *Pesticidi i fitomedicina*. 2012; 27 (4): 283–297.
- Ioos R., Frey P. Genomic variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR. *European Journal of Plant Pathology*. 2000; 106 (4): 373–378.
- Lane C.R. A synoptic key for differentiation of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena* and *M. laxa*, based on examination of cultural characters. *EPPO Bulletin*. 2002; 32 (3): 489–493.
- Michailides T.J., Morgan D.P. et al. Detection and significance of symptomless latent infection of *Monilinia fructicola* in California stone fruit (abstr.). *Phytopathology*. 2000; 90: 48.
- Van Brouwershaven I.R. et al. A real-time (TaqMan) PCR assay to differentiate *Monilinia fructicola* from other brown rot fungi of fruit crops. *Plant Pathology*. 2010; 59 (3): 548–555.
- White T.J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 1990; 18 (1): 315–322.

УДК 632.3

Диагностика бегомовирусов методом ПЦР

Е.Н. ЛОЗОВАЯ, научный сотрудник отдела аспирантуры ФГБУ «ВНИИКР»,
e-mail: evgeniyaf@mail.ru

Ю.Н. ПРИХОДЬКО, к. с.-х. н., ведущий научный сотрудник НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР»,
e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru

Т.С. ЖИВАЕВА, научный сотрудник НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР», e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru

Ю.А. ШНЕЙДЕР, к. б. н., и. о. заместителя директора ФГБУ «ВНИИКР», e-mail: yury.shneyder@mail.ru

Аннотация. Род *Begomovirus* включает более 190 видов вирусов, являющихся вредоносными патогенами овощных и полевых культур. Широко распространенный в Европе бегомовирус желтой курчавости листьев томата (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) является карантинным объектом для Российской Федерации, ЕАЭС и ЕОКЗР. Идентификация бегомовирусов до видового уровня сопряжена с определенными трудностями, обусловленными высокой идентичностью их генома. В статье приводятся результаты испытания 19 пар универсальных и специфических праймеров для диагностики бегомовирусов: вируса желтой курчавости листьев томата TYLCV, вируса желтой курчавости листьев томата Сардиния (*Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*, TYLCSV) и Нью-Дели вируса курчавости листьев томата (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV) методами классической ПЦР и ПЦР в реальном времени.

Ключевые слова. Бегомовирусы, вирус желтой курчавости листьев томата (TYLCV), полимеразная цепная реакция, универсальные и специфические праймеры, специфичность, чувствительность, воспроизводимость.



од Begomovirus входит в семейство Geminiviridae. Геминивирусы – одно из немногих семейств вирусов растений, геном которых состоит из одной или двух молекул кольцевой одноцепочечной ДНК. Вирионы геминивирусов также имеют уникальную морфологию, так как состоят из двух неполных икосаэдров размером около 38 x 22 нм (рис. 1).

Род Begomovirus является самым крупным в семействе Geminiviridae и в настоящее время включает 388 видов, распространенных преимущественно в странах с тропическим и субтропическим климатом. Представители этого рода заражают

UDC 632.3

Diagnosis of begomoviruses by PCR

E.N. LOZOVAIA, Researcher of the Postgraduate Study Department of FGBU “VNIIKR”,
e-mail: evgeniyaf@mail.ru

Y.N. PRIKHODKO, PhD in Agriculture, Leading Researcher of the Research and Methodology Department for Virology and Bacteriology of FGBU “VNIIKR”, e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru

T.S. ZHIVAEVA, Researcher of the Research and Methodology Department for Virology and Bacteriology of FGBU “VNIIKR”,
e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru

Y.A. SHNEYDER, PhD in Biology, Acting Deputy Director of FGBU “VNIIKR”,
e-mail: yury.shneyder@mail.ru

Abstract. The genus *Begomovirus* includes more than 190 species of viruses, which are harmful pathogens of vegetable and field crops. Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), which is widely spread in Europe, is a quarantine object for the Russian Federation, EAEU and EPPO. Identifying begomoviruses to the species level involves certain difficulties due to the high identity of their genome. The article presents the results of testing 19 pairs of universal and specific primers for the diagnosis of begomoviruses: tomato leaf curl virus (TYLCV), tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV), and tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) by conventional and real-time PCR methods.

Keywords. Begomoviruses, tomato leaf curl virus (TYLCV), polymerase chain reaction, universal and specific primers, specificity, sensitivity, reproducibility.

The genus Begomovirus is part of the Geminiviridae family. Geminiviruses are one of the few plant virus families whose genome consists of one or two molecules of a single-chain circular DNA. Virions of geminiviruses also have a unique morphology, as they consist of two incomplete icosahedrons about 38 x 22 nm (Fig. 1).

The genus *Begomovirus* is the largest in the Geminiviridae family and currently includes 388 species,

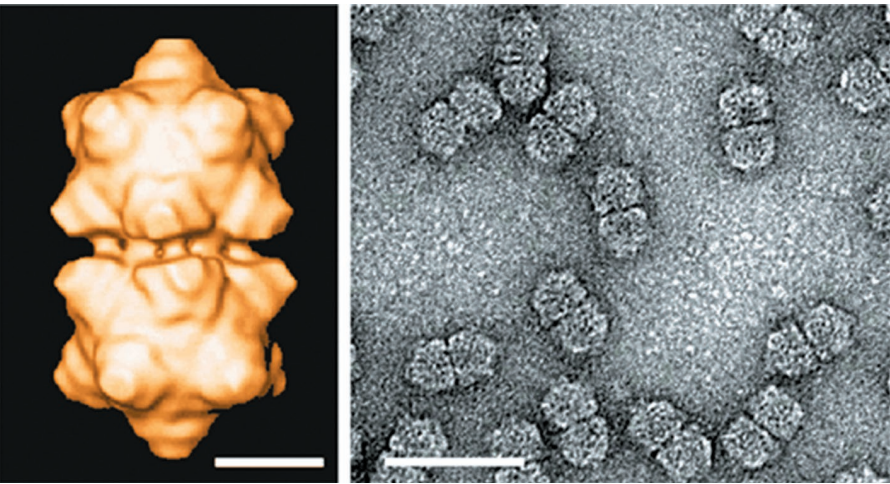


Рис. 1. Вирионы ToLCNDV и их криоэлектронная микроскопическая реконструкция. Бар составляет 50 нм (Brown et al., 2015) [5]

Fig. 1. ToLCNDV virions and their cryoelectronic microscopic reconstruction. The bar is 50 nm (Brown et al., 2015) [5]

двудольные растения и передаются исключительно табачной белокрылкой *Bemisia tabaci*. Ранее этот род был известен также как подгруппа III геминивирусов, или группа вируса золотистой мозаики бобов [5]. В регионе ЕОКЗР в настоящее время уже распространены следующие бегомовирусы: вирус желтой курчавости листьев томата (TYLCV), вирус желтой курчавости листьев томата Сардиния (TYLCSV), вирус желтой курчавости листьев томата Малага (TYLCMaV), вирус желтой курчавости листьев томата Ахаркуа (TYLCAxV) и Нью-Дели вирус курчавости листьев томата (ToLCNDV) [11].



Рис. 2. Типичные симптомы, вызываемые TYLCV на растениях томата (CABI, 2020) [6]

Fig. 2. Typical symptoms caused by TYLCV on tomato plants (CABI, 2020) [6]



Рис. 3. Симптомы, вызываемые ToLCNDV на растениях цуккини (www.juntadeandalucia.es)

Fig. 3. Symptoms caused by ToLCNDV on zucchini plants (www.juntadeandalucia.es)

distributed mainly in countries with tropical and subtropical climates. Representatives of this genus infect dicotyledons and are transmitted only by tobacco whitefly *Bemisia tabaci*. Earlier this genus was also known as subgroup III of geminiviruses, or group of bean golden mosaic virus [5].

The following begomoviruses are now common in the EPPO region: tomato leaf curl virus (TYLCV), tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV), tomato yellow leaf curl Malaga virus (TYLCMaV), tomato yellow leaf curl Acharquia virus (TYLCAxV) and tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) [11].

TYLCV is a quarantine object for the Russian Federation, EAEU and EPPO. ToLCNDV has been in the EPPO Alert list since 2015. TYLCSV, TYLCAxV and TYLCMaV were previously considered to be TYLCV strains, therefore, quarantine restrictions should also apply to these species [8].

The main host plant of TYLCV, TYLCSV, TYLCAxV and TYLCMaV is tomato (*Solanum lycopersicum*). TYLCV also infects pepper plants and some other solanaceous, pumpkin and legume crops much less frequently. ToLCNDV was first described on a tomato, but nowadays it is mostly spread on different pumpkin cultures. In India and Pakistan, however, ToLCNDV is one of the most dangerous potato pathogens [6].

TYLCV является карантинным объектом для Российской Федерации, ЕАЭС и ЕОКЗР. ToLCNDV с 2015 г. входит в сигнальный список ЕОКЗР. TYLCSV, TYLCAxV и TYLCMaV ранее считались штаммами TYLCV, поэтому карантинные ограничения должны распространяться и на эти виды [8].

Основным растением – хозяином TYLCV, TYLCSV, TYLCAxV и TYLCMaV является томат (*Solanum lycopersicum*). TYLCV значительно реже заражает также растения перца и некоторых других пасленовых, тыквенных и бобовых культур. ToLCNDV был впервые описан на томате, но в настоящее время распространен преимущественно на различных тыквенных культурах. Однако в Индии и Пакистане ToLCNDV является одним из опасных патогенов картофеля [6].

Все распространенные в Европе бегомовирусы вызывают на томате болезнь, получившую название «желтая курчавость листьев томата». Болезнь проявляется в развитии мелких, с пожелтевшими краями, чашеобразно загнутых вниз деформированных листьев. Междоузлия на побегах укорачиваются, вследствие чего зараженные растения заметно отстают в росте от здоровых (рис. 2). Потери урожая могут достигать 100% [6].

ToLCNDV вызывает на растениях тыквенных культур мозаику, хлороз, сильное скручивание и морщинистость листьев, утолщение жилок листьев, карликовость растений (рис. 3).

Бегомовирусы различаются генетически, но имеют практически идентичную биологию, морфологию вирионов и симптоматику на растениях томата, а также являются серологически близкородственными. Скрининговые серологические тесты с использованием поликлональных антител, как правило, позволяют идентифицировать бегомовирусы лишь до уровня рода. Единственным методом, позволяющим проводить объективную идентификацию бегомовирусов до видового уровня, является полимеразная цепная реакция (ПЦР) [1, 13, 16].

Для выявления бегомовирусов разработаны многочисленные модификации тестов на основе ПЦР с использованием видоспецифичных или универсальных праймеров, которые проводятся в формате классической ПЦР с электрофоретической детекцией результатов или в формате ПЦР в режиме реального времени и часто комбинируются с методами отпечатка тканей, иммуноблоттинга и рестрикционного анализа. До наших исследований диагностика бегомовирусов методом ПЦР не была апробирована в Российской Федерации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ФГБУ «ВНИИКР» проведено испытание 19 пар универсальных и специфических праймеров для диагностики вируса желтой курчавости листьев томата (TYLCV), вируса желтой курчавости листьев томата Сардиния (TYLCSV) и Нью-Дели вируса курчавости листьев томата (ToLCNDV) методами классической ПЦР и ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).

В работе использовали следующие изоляты бегомовирусов: TYLCV PV-0844, TYLCV-Isr PV-0560, TYLCV + ACMV PV-0588, TYLCSV PV-0596, TYLCSV PV-0561, ToLCNDV PC-1109, ToLCNDV PC-1111, ACMV PC-0873, BGMV PC-0094 (все – из коллекции

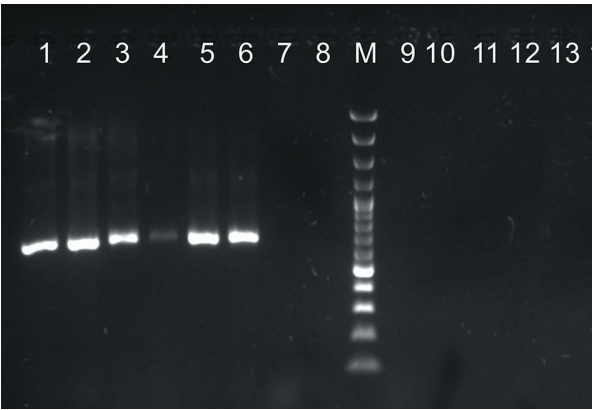


Рис. 4. Реакция праймеров TYLCV-Sar/TYLCV-Is (Pico et al., 1999) [21] с изолятами различных бегомовирусов (набор реагентов Screen Mix-HS, специфический продукт – 667 п. н.) Образцы:

1 TYLCV-Isr PC-0560 (DSMZ)	8 ACMV PC-0873 (DSMZ)
2 TYLCV PV-0844 (DSMZ)	9 ToLCNDV PC-1109 (DSMZ)
3 TYLCV P-10501202 (Adgen)	10 ToLCNDV PC-1111 (DSMZ)
4 TYLCV – g842 (ВНИИКР)	11 BGMV PC-0094 (DSMZ)
5 TYLCSV PV-0561 (DSMZ)	12 Отрицательный контроль (Adgen)
6 TYLCSV PC-0596 (DSMZ)	13 Отрицательный контроль (вода)
7 ACMV PV-0588 (DSMZ)	

Fig. 4. Reaction of TYLCV-Sar/TYLCV-Is primers (Pico et al., 1999) [21] with isolates of various begomoviruses (Screen Mix-HS kit, specific product – 667 b. p.) Samples:

1 TYLCV-Isr PC-0560 (DSMZ)	8 ACMV PC-0873 (DSMZ)
2 TYLCV PV-0844 (DSMZ)	9 ToLCNDV PC-1109 (DSMZ)
3 TYLCV P-10501202 (Adgen)	10 ToLCNDV PC-1111 (DSMZ)
4 TYLCV – g842 (ФГБУ «ВНИИКР»)	11 BGMV PC-0094 (DSMZ)
5 TYLCSV PV-0561 (DSMZ)	12 Negative control (Adgen)
6 TYLCSV PC-0596 (DSMZ)	13 Negative control (water)
7 ACMV PV-0588 (DSMZ)	

All begomoviruses common in Europe cause a disease called tomato yellow leaf curl. The disease manifests itself in the development of small, yellowish, cup-shaped deformed leaves. The internode on shoots is shortened, so that infected plants noticeably lag behind healthy ones in growth (Fig. 2). Crop losses can reach 100% [6].

ToLCNDV causes on pumpkin plants mosaic, chlorosis, strong leaf roll and crinkle, thickening of leaf veins, dwarfism of plants (Fig. 3).

Begomoviruses differ genetically, but have almost identical biology, virion morphology and symptomatology on tomato plants, and are serologically related. Screening serological tests with use of polyclonal antibodies, as a rule, only allow to identify begomoviruses up to a genus level. The only method that can reliably identify begomoviruses to species level is polymerase chain reaction (PCR) [1, 13, 16].

DSMZ, Германия), TYLCV-g 842, TYLCV Kaz-1 (ФГБУ «ВНИИКР») и TYLCV P-10501202 (Adgen, Великобритания).

Специфичность испытуемых праймеров оценивали с референтными изолятами следующих вирусов из коллекции DSMZ (Германия), заражающих растения пасленовых культур: AMV, APLV, APMoV, INSV, PAMV, PBRSV, PepMV, PLRV, PVM, PVS, PVX, PVY, PYDV, PYV, TBRV, TMV, ToCV, ToRSV, TRSV и TSWV.

Для выделения ДНК и РНК вирусов из растительных тканей применяли наборы реагентов «Проба-НК» («Агродиагностика», Россия) и «Фито-Сорб-М» («Синтол», Россия), которые использовали согласно инструкциям фирм-производителей.

Испытания праймеров проводили с наборами реагентов для ПЦР, указанными в таблице 1. Наборы использовали согласно инструкциям фирм-производителей.

Для отработки диагностики бегомовирусов было испытано 15 пар праймеров, характеристика которых представлена в таблице 2.

Кроме того, в качестве подтверждающего теста был испытан набор реагентов для выявления TYLCV методом ПЦР-РВ фирмы «Агродиагностика» (Россия). Последовательности нуклеотидов, входящих в данный набор праймеров, и последовательность зонда фирмой-производителем не разглашаются.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Краткая информация о результатах экспериментов по отработке диагностики бегомовирусов представлена в таблице 3.

Установлено, что универсальные праймеры Gemini-A146/Gemini-A672 [7] реагируют с изолятами распространенных в Европе бегомовирусов TYLCV, TYLCSV и ToLCNDV и могут быть использованы для проведения скрининговых тестов на наличие этих бегомовирусов. Не отмечена реакция данных праймеров с бегомовирусами ACMV (африканский вирус мозаики маниока) и BGMV (вирус золотистой мозаики фасоли). Однако ввиду образования неспецифических продуктов констатируется необходимость дальнейшей отработки тестов с этими праймерами.

Подтверждена дуплексная реакция праймеров TY1/TY2 [2] и TYLCV-Sar/TYLCV-Is [21] с TYLCV и TYLCSV, наряду с отсутствием их реакции с ToLCNDV, ACMV и BGMV (рис. 4). Установлена возможность использования этих праймеров с различными наборами реагентов для классической ПЦР отечественных фирм-производителей при достаточно высоком уровне чувствительности тестов (разведение инфекционного экстракта в 10⁻³–10⁻⁴). Констатируется, что праймеры TY1/TY2 и TYLCV-Sar/TYLCV-Is могут быть рекомендованы для проведения скрининговых тестов на наличие TYLCV и TYLCSV с последующим секвенированием получаемых продуктов амплификации или использованием специфических праймеров.

Отработан мультиплексный тест с праймерами TY-209F/TY-575R (специфичны к TYLCV) и TY-613F/TY-1363R (специфичны к TYLCSV) [20] для одновременного выявления TYLCV и TYLCSV. Установлено, что данный тест позволяет диагностировать как моноинфекцию TYLCV и TYLCSV, так и смешанную инфекцию этих вирусов (рис. 5).

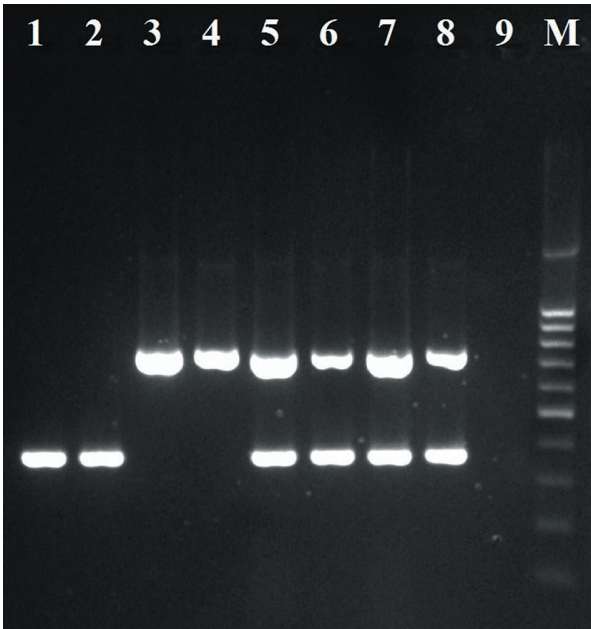


Рис. 5. Мультиплексная ПЦР на наличие TYLCV и TYLCSV с праймерами TY-209F/TY-575R и TY-613F/TY-1363R (F. Pellegrin et al., 2008) [20] (набор реагентов Qiagen Multiplex PCR Kit, специфические продукты: для TYLCV – 750 п. н., TYLCSV – 366 п. н.)
Образцы:

1 TYLCSV PV-0561 (DSMZ)	6 TYLCSV PV-0561 + TYLCV PV-0844 (DSMZ)
2 TYLCSV PV-0596 (DSMZ)	7 TYLCSV PV-0596 + TYLCV PC-0560 (DSMZ)
3 TYLCV PC-0560 (DSMZ)	8 TYLCSV PV-0596 + TYLCV PV-0844 (DSMZ)
4 TYLCV PV-0844 (DSMZ)	9 Отрицательный контроль (вода)
5 TYLCSV PV-0561 + TYLCV PC-0560 (DSMZ)	

Fig. 5. Multiplex PCR for TYLCV and TYLCSV with TY-209F/TY-575R and TY-613F/TY-1363R primers (Pellegrin et al., 2008) [20] (Qiagen Multiplex PCR Kit, specific products: for TYLCV – 750 b. p., for TYLCSV – 366 b. p.)
Samples:

1 TYLCSV PV-0561 (DSMZ)	6 TYLCSV PV-0561 + TYLCV PV-0844 (DSMZ)
2 TYLCSV PV-0596 (DSMZ)	7 TYLCSV PV-0596 + TYLCV PC-0560 (DSMZ)
3 TYLCV PC-0560 (DSMZ)	8 TYLCSV PV-0596 + TYLCV PV-0844 (DSMZ)
4 TYLCV PV-0844 (DSMZ)	9 Negative control (water)
5 TYLCSV PV-0561 + TYLCV PC-0560 (DSMZ)	

Numerous modifications of PCR tests have been developed for the detection of begomoviruses using species-specific or universal primers, which are conducted in conventional PCR with electrophoretic detection of results or in real-time PCR (qPCR) format and often combined with tissue imprinting, immunoblotting and RFLP-analysis. Before our research, the diagnosis of begomoviruses by PCR has not been tested in the Russian Federation.

RESEARCH MATERIALS AND METHODS
FGBU “VNIIKR” tested 19 pairs of universal and

Таблица 1
Наборы реагентов для ПЦР, используемые для отработки диагностики бегомовирусов

№ п/п	Набор реагентов для ПЦР	Фирма-производитель	Страна
1	2,5х Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ	Синтол	Россия
2	2,5х Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ с красителем ROX	Синтол	Россия
3	2,5х Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ с красителем SYBR Green-1	Синтол	Россия
4	qPCRmix – HS	Евроген	Россия
5	qPCRmix – HS ROX	Евроген	Россия
6	qPCRmix-HS SYBR + High Rox	Евроген	Россия
7	Tersus PCR Kit	Евроген	Россия
8	Encyclo PCR Kit	Евроген	Россия
9	5x Mas ^{DD} Mix-2025	Диалат	Россия
10	5x Mas ^{CPE} Mix-2025	Диалат	Россия
11	Dream Taq Green PCR Master Mix	Thermo Scientific	США
12	Dream Taq PCR Master Mix	Thermo Scientific	США
13	Qiagen Multiplex PCR Kit	Qiagen	Нидерланды

Table 1
PCR kits used to test the diagnosis of begomoviruses

No. Item	PCR kit	Manufacturer	Country
1	2.5x reaction mixture for RT-PCR	Sintol	Russia
2	2.5x reaction mixture for RT-PCR with ROX dye	Sintol	Russia
3	2.5x reaction mixture for RT-PCR with SYBR Green-1 dye	Sintol	Russia
4	qPCRmix – HS	Evrogen	Russia
5	qPCRmix – HS ROX	Evrogen	Russia
6	qPCRmix-HS SYBR + High Rox	Evrogen	Russia
7	Tersus PCR Kit	Evrogen	Russia
8	Encyclo PCR Kit	Evrogen	Russia
9	5x Mas ^{DD} Mix-2025	Dialat	Russia
10	5x Mas ^{CPE} Mix-2025	Dialat	Russia
11	Dream Taq Green PCR Master Mix	Thermo Scientific	USA
12	Dream Taq PCR Master Mix	Thermo Scientific	USA
13	Qiagen Multiplex PCR Kit	Qiagen	Netherlands

По результатам проведенных экспериментов констатируется высокая специфичность к TYLCV рекомендуемых в литературе праймеров HD-1/HD-2 [9], V781/C1256 [4], V1769/C2120 [4], Tuv-2664/Tuv-138 [3] и разработанных нами праймеров TYLCV-P1F/TYLCV-P1R. Все эти пары праймеров реагировали лишь с изолятами целевого объекта – TYLCV и не реагировали с нецелевыми бегомовирусами – TYLCSV, ToLCNDV, ACMV и BGMV.

specific primers for the diagnosis of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), yellow tomato leaf curl Sardinia virus (TYLCSV) and tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) using conventional and qPCR.

Таблица 2
 Характеристика праймеров, используемых в экспериментах по диагностике бегомовирусов методом ПЦР

Название праймера	Последовательность 5’→3’	Tm (°C)	Длина продукта (п. н.)	Автор
TY1	GCC CAT GTA YCG RAA GCC	61	580	Accotto et al., 2000; EPPO, 2005 [2] [10]
TY2	GGR TTA GAR GCA TGM GTA C			
HD1	CGG AAT TCG CCC ACC AAT AAC TGT AGC	59	674	El-gaied et al., 2008 [9]
HD2	CGG GAT CCG CAG TCC GTT GAG GAA ACT TAC			
Gemini – A146	TAA TAT TAC CKG WKG VCC SC	53	500	Deng et al., 1994 [7]
Gemini – A672	TGG ACY TTR CAW GGB CCT TCA ACA			
TYLCV-Sar	GCC ATA TAC AAT AAC AAG GC	59	667	Pico et al., 1999 [21]
TYLCV-Is	CGC CCG TCT CGA AGG TTC			
V781	CTC ACA GAG TGG GTA AGA GG	57	480	Atzmon et al., 1998 [4]
C1256	TTA ATT TGA TAT TGA ATC ATA GAA ATA G			
V1769	GCG AAC AGT GGC TCG TAG AGG G	60	350	Atzmon et al., 1998 [4]
C2120	CAG GCA AAA ACA ATG TGG GCC AGG			
V1769	GCG AAC AGT GGC TCG TAG AGG G	60,4	353	Atzmon et al., 1998 [4], в модификации ВНИИКР
C2120a	ACA GGC AAA ACA ATG TGG GCC AGG			
MA-14	TGC ATT TAT TTG AAA ACG	52	353	Navas-Castillo et al., 1999 [17]
MA-15	AAA GGA TCC CAC ATA TTG			
TYv2664	ATT GAC CAA GAT TTT TAC ACT TAT CCC	62	316	Anfoka et al., 2005 [3]
TYc138	AAG TGG GTC CCA CAT ATT GCA AGAC			
PsSic-2267	TGG AAA GTT CCC CAT TCA AGA ACA TC	59	891	Atzmon et al., 1998 [4]
PcRvc-397	TGC CTT GGA CAR TGG GG R CAG CAG			
ToLCNDV-BF	AAT ACA CGC GTA AGG AAA TAT GT	58	891	Ruiz et al., 2015 [22]
ToLCNDV-BR	AGT CAT GGG CTA GCA GAT CG			
MA1788	CGT GTC GTT TCG ATC TGG TGTC	60	269	Fortes et al., 2016 [12]
MA1789	GTT TGT GGA TCT AAA CTT GGT GAG			
MA115	GAA AGT ACC CCA TTC AAG AAC	54	552	Monci et al., 2002 [15]
MA116	GTA GGG CCC ACT ACT TTA TC			
TY-209F	CTY GCA ATW AAA TAT TTG CAG CTA	60	750	Pellegrin et al., 2008 [20]
TY-575R	CAA CAC CRG TAT GCT TSA CG			
TY-613F	GAA TTA CTC ACA GAG TSG GTA AGA	60	366	Pellegrin et al., 2008 [20]
TY-1363R	GAA CCA CGA CAT CAT TTC CA			
TYLCV-P1F	AGG CAT GCG TAC ATG CCA TA	53,8	282	HMOBB ВНИИКР
TYLCV-P1R	GGC CCT ATG GAA ACA GTC CA			
TYLCSV-P2F	AGC ATA CCG GTG TTG TTC GT	60	341	HMOBB ВНИИКР
TYLCSV-P2R	CTG CTC CTT CAT CCC TGA CG			
TYLCSV-P3F	AAG CCG CGG ATG TAC AGA AT	60	90	HMOBB ВНИИКР
TYLCSV-P3R	GTC ACG CTG CTC ATA CGA CT			
TYLCV-F	ACG CTT ACG CCT TAT TGG TTT C	60	62	Papayiannis et al., 2011 [19]
TYLCV-R	CGA GCC ACT GTT CGC AAG T			
TYLCV-P	FAM-TCT TGG CTA TCT TGT GTT GGA CCT TGA TTG AT-BHQ1			

Table 2
 Characteristics of primers used in experiments to diagnose begomoviruses with the PCR

Primer name	Sequence 5’→3’	Tm (°C)	Product length (b. p.)	Author
TY1	GCC CAT GTA YCG RAA GCC	61	580	Accotto et al., 2000; EPPO, 2005 [2] [10]
TY2	GGR TTA GAR GCA TGM GTA C			
HD1	CGG AAT TCG CCC ACC AAT AAC TGT AGC	59	674	El-gaied et al., 2008 [9]
HD2	CGG GAT CCG CAG TCC GTT GAG GAA ACT TAC			
Gemini – A146	TAA TAT TAC CKG WKG VCC SC	53	500	Deng et al., 1994 [7]
Gemini – A672	TGG ACY TTR CAW GGB CCT TCA ACA			
TYLCV-Sar	GCC ATA TAC AAT AAC AAG GC	59	667	Pico et al., 1999 [21]
TYLCV-Is	CGC CCG TCT CGA AGG TTC			
V781	CTC ACA GAG TGG GTA AGA GG	57	480	Atzmon et al., 1998 [4]
C1256	TTA ATT TGA TAT TGA ATC ATA GAA ATA G			
V1769	GCG AAC AGT GGC TCG TAG AGG G	60	350	Atzmon et al., 1998 [4]
C2120	CAG GCA AAA ACA ATG TGG GCC AGG			
V1769	GCG AAC AGT GGC TCG TAG AGG G	60.4	353	Atzmon et al., 1998 [4], modified by FGBU “VNIIKR”
C2120a	ACA GGC AAA ACA ATG TGG GCC AGG			
MA-14	TGC ATT TAT TTG AAA ACG	52	353	Navas-Castillo et al., 1999 [17]
MA-15	AAA GGA TCC CAC ATA TTG			
TYv2664	ATT GAC CAA GAT TTT TAC ACT TAT CCC	62	316	Anfoka et al., 2005 [3]
TYc138	AAG TGG GTC CCA CAT ATT GCA AGAC			
PsSic-2267	TGG AAA GTT CCC CAT TCA AGA ACA TC	59	891	Atzmon et al., 1998 [4]
PcRvc-397	TGC CTT GGA CAR TGG GG R CAG CAG			
ToLCNDV-BF	AAT ACA CGC GTA AGG AAA TAT GT	58	891	Ruiz et al., 2015 [22]
ToLCNDV-BR	AGT CAT GGG CTA GCA GAT CG			
MA1788	CGT GTC GTT TCG ATC TGG TGTC	60	269	Fortes et al., 2016 [12]
MA1789	GTT TGT GGA TCT AAA CTT GGT GAG			
MA115	GAA AGT ACC CCA TTC AAG AAC	54	552	Monci et al., 2002 [15]
MA116	GTA GGG CCC ACT ACT TTA TC			
TY-209F	CTY GCA ATW AAA TAT TTG CAG CTA	60	750	Pellegrin et al., 2008 [20]
TY-575R	CAA CAC CRG TAT GCT TSA CG			
TY-613F	GAA TTA CTC ACA GAG TSG GTA AGA	60	366	Pellegrin et al., 2008 [20]
TY-1363R	GAA CCA CGA CAT CAT TTC CA			
TYLCV-P1F	AGG CAT GCG TAC ATG CCA TA	53.8	282	Research and Methodology Department for Virology and Bacteriology of FGBU “VNIIKR”
TYLCV-P1R	GGC CCT ATG GAA ACA GTC CA			
TYLCSV-P2F	AGC ATA CCG GTG TTG TTC GT	60	341	Research and Methodology Department for Virology and Bacteriology of FGBU “VNIIKR”
TYLCSV-P2R	CTG CTC CTT CAT CCC TGA CG			
TYLCSV-P3F	AAG CCG CGG ATG TAC AGA AT	60	90	Research and Methodology Department for Virology and Bacteriology of FGBU “VNIIKR”
TYLCSV-P3R	GTC ACG CTG CTC ATA CGA CT			
TYLCV-F	ACG CTT ACG CCT TAT TGG TTT C	60	62	Papayiannis et al., 2011 [19]
TYLCV-R	CGA GCC ACT GTT CGC AAG T			
TYLCV-P	FAM-TCT TGG CTA TCT TGT GTT GGA CCT TGA TTG AT-BHQ1			

Таблица 3
 Результаты экспериментов по отработке диагностики бегомовирусов

№ п/п	Праймеры	Целевые объекты	Рекомендуемые наборы реагентов	Специфичность (%)	Чувствительность
1	Gemini-A146/Gemini-A672 (Deng et al., 1994)	TYLCV, TYLCSV, ToLCNDV	Mas ^{DD} Mix-2025	100	Не определяли
2	TY1/TY2 (Accotto et al., 2000)	TYLCV, TYLCSV	MagMIX-2025, Encyclo-plus, PCR Kit, Dream Taq Green PCR Master Mix	100	10 ⁻³
3	TYLCV-Sar/TYLCV-Is (Pico et al., 1999)	TYLCV, TYLCSV	Mas ^{DD} Mix-2025, Screen Mix, Screen Mix-HS	100	10 ⁻⁴
4	HD-1/HD-2 (El-gaied et al., 2008)	TYLCV	MagMIX-2025, Encyclo-plus PCR Kit	100	10 ⁻⁴
5	V781/C1256 (Atzmon et al., 1998)	TYLCV	Mas ^{DD} Mix-2025, MagMIX-2025, Dream Taq PCR Master Mix, Dream Taq Green PCR Master Mix	100	10 ⁻⁴
6	V1769/C2120 (Atzmon et al., 1998)	TYLCV	Mas ^{DD} Mix-2025	100	10 ⁻⁴
7	V1769/C2120a (Atzmon et al., 1998, в нашей модификации)	TYLCV	Mas ^{DD} Mix-2025, Screen Mix-HS	100	10 ⁻⁴
8	Tyv-2664/Tyv-138 (Anfoka et al., 2005)	TYLCV	Mas ^{DD} Mix-2025, Screen Mix-HS, Dream Taq Green PCR Master Mix	100	10 ⁻⁴
9	TYLCV-P1F/TYLCV-P1R (НМОВБ ВНИИКР)	TYLCV	Dream Taq PCR Master Mix	100	10 ⁻²
10	TYLCV-F/TYLCV-R, зонд TYLCV-P (Papayiannis et al., 2011)	TYLCV	qPCRmix-HS, qPCRmix-HS ROX, qPCRmix-HS SYBR-High ROX, 2,5x Реакционная смесь для проведения ПЦР-PB в присутствии ROX	100	10 ⁻⁶
11	Набор для ПЦР-PB к TYLCV (Агродиагностика, Россия)	TYLCV	Комплект реагентов для ПЦР-PB к TYLCV (Агродиагностика, Россия)	100	10 ⁻⁶
12	TY-209F/TY-575R (Pellegrin et al., 2008)	TYLCV	Qiagen Multiplex PCR Kit	100	Не определяли
13	TY-613F/TY-1363R (Pellegrin et al., 2008)	TYLCSV	Qiagen Multiplex PCR Kit	100	Не определяли
14	MA-14/MA-15 (Navas-Castillo et al., 1999)	TYLCSV	Dream Taq Green PCR Master Mix	60	10 ⁻⁷
15	PsSic-2267/PCRvc-397 (Gorsane et al., 2005)	TYLCSV	Tersus PCR Kit, Mas ^{DD} Mix-2025	90	Не определяли
16	MA115/MA116 (Monci et al., 2002)	TYLCSV	Screen Mix-HS	100	Не определяли
17	TYLCSV-P2F/TYLCSV-P2R (НМОВБ ВНИИКР)	TYLCSV	Screen Mix-HS, Qiagen Multiplex PCR Kit	100	Не определяли
18	TYLCSV-P3F/TYLCSV-P3R (НМОВБ ВНИИКР)	TYLCSV	Screen Mix-HS, Qiagen Multiplex PCR Kit	100	Не определяли
19	ToLCNDV-BF/ToLCNDV-BR (Ruiz et al., 2015)	ToLCNDV	Screen Mix-HS, Mas ^{DD} Mix-2025	100	10 ⁻⁶
20	MA1788/MA1789 (Fortes et al., 2016)	ToLCNDV	Screen Mix-HS, Mas ^{DD} Mix-2025, Dream Taq PCR Master Mix	100	Не определяли

Table 3
 Results of experiments on developing the diagnosis of begomoviruses

No. Item	Primers	Target objects	Recommended kits	Specificity (%)	Sensitivity
1	Gemini-A146/Gemini-A672 (Deng et al., 1994)	TYLCV, TYLCSV, ToLCNDV	Mas ^{DD} Mix-2025	100	Not established
2	TY1/TY2 (Accotto et al., 2000)	TYLCV, TYLCSV	MagMIX-2025, Encyclo-plus, PCR Kit, Dream Taq Green PCR Master Mix	100	10 ⁻³
3	TYLCV-Sar/TYLCV-Is (Pico et al., 1999)	TYLCV, TYLCSV	Mas ^{DD} Mix-2025, Screen Mix, Screen Mix-HS	100	10 ⁻⁴
4	HD-1/HD-2 (El-gaied et al., 2008)	TYLCV	MagMIX-2025, Encyclo-plus PCR Kit	100	10 ⁻⁴
5	V781/C1256 (Atzmon et al., 1998)	TYLCV	Mas ^{DD} Mix-2025, MagMIX-2025, Dream Taq PCR Master Mix, Dream Taq Green PCR Master Mix	100	10 ⁻⁴
6	V1769/C2120 (Atzmon et al., 1998)	TYLCV	Mas ^{DD} Mix-2025	100	10 ⁻⁴
7	V1769/C2120a (Atzmon et al., 1998, modified by us)	TYLCV	Mas ^{DD} Mix-2025, Screen Mix-HS	100	10 ⁻⁴
8	Tyv-2664/Tyv-138 (Anfoka et al., 2005)	TYLCV	Mas ^{DD} Mix-2025, Screen Mix-HS, Dream Taq Green PCR Master Mix	100	10 ⁻⁴
9	TYLCV-P1F/TYLCV-P1R (Research and Methodology Department for Virology and Bacteriology of FGBU “VNIIKR”)	TYLCV	Dream Taq PCR Master Mix	100	10 ⁻²
10	TYLCV-F/TYLCV-R, probe TYLCV-P (Papayiannis et al., 2011)	TYLCV	qPCRmix-HS, qPCRmix-HS ROX, qPCRmix-HS SYBR-High ROX, 2.5x reaction mixture for RT-PCR with ROX	100	10 ⁻⁶
11	RT-PCR Kit for TYLCV (Agrodiagnostika, Russia)	TYLCV	RT-PCR Reagent Kits for TYLCV (Agrodiagnostika, Russia)	100	10 ⁻⁶
12	TY-209F/TY-575R (Pellegrin et al., 2008)	TYLCV	Qiagen Multiplex PCR Kit	100	Not established
13	TY-613F/TY-1363R (Pellegrin et al., 2008)	TYLCSV	Qiagen Multiplex PCR Kit	100	Not established
14	MA-14/MA-15 (Navas-Castillo et al., 1999)	TYLCSV	Dream Taq Green PCR Master Mix	60	10 ⁻⁷
15	PsSic-2267/PCRvc-397 (Gorsane et al., 2005)	TYLCSV	Tersus PCR Kit, Mas ^{DD} Mix-2025	90	Not established
16	MA115/MA116 (Monci et al., 2002)	TYLCSV	Screen Mix-HS	100	Not established
17	TYLCSV-P2F/TYLCSV-P2R (Research and Methodology Department for Virology and Bacteriology of FGBU “VNIIKR”)	TYLCSV	Screen Mix-HS, Qiagen Multiplex PCR Kit	100	Not established
18	TYLCSV-P3F/TYLCSV-P3R (Research and Methodology Department for Virology and Bacteriology of FGBU “VNIIKR”)	TYLCSV	Screen Mix-HS, Qiagen Multiplex PCR Kit	100	Not established
19	ToLCNDV-BF/ToLCNDV-BR (Ruiz et al., 2015)	ToLCNDV	Screen Mix-HS, Mas ^{DD} Mix-2025	100	10 ⁻⁶
20	MA1788/MA1789 (Fortes et al., 2016)	ToLCNDV	Screen Mix-HS, Mas ^{DD} Mix-2025, Dream Taq PCR Master Mix	100	Not established

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, Fam	Ср, Hex	Результат
A1	TYLCV_PV-0560	15,6		+
A2	TYLCV_PV-0844	11,7		+
A3	TYLCV_P-10501202	20,3		+
A4	TYLCV_g-842	12,7		+
A5	TYLCSV_PC-0596			-
A6	TYLCSV_PC-0561			-
A7	TYLCV+ACMV_PC-0588			-
A8	ACMV_PC-0873			-
B1	ToLCNDV_PC-1109			-
B2	ToLCNDV_PC-1111			-
B3	BCMV_PC-0094			-
B4	-K_раст_			-
B5	K+	16,2		+
B6	K-			-

Рис. 6. Выявление TYLCV методом ПЦР в реальном времени с использованием праймеров TYLCV-F/TYLCV-R и зонда TYLCV-P (Papayiannis et al., 2011) [19]

Fig. 6. Real-time detection of TYLCV by qPCR using TYLCV-F/TYLCV-R primers and TYLCV-R probe (Papayiannis et al., 2011) [19]

При использовании различных наборов реагентов наиболее высокая воспроизводимость результатов констатирована для праймеров HD-1/HD-2 и V781/C1256. Воспроизводимость результатов в тестах с праймерами V1769/C2120 и Tyv-2664/Tyv-138 существенно зависела от используемых наборов реагентов для ПЦР.

В тестах с праймерами V1769/C2120 и большинством испытываемых наборов реагентов наблюдалось образование многочисленных неспецифических продуктов амплификации («шмеров»). После ряда экспериментов нами была проведена модификация обратного праймера C2120 (табл. 2), которая позволила эффективно, селективно и с высокой чувствительностью диагностировать изоляты TYLCV без образования каких-либо неспецифических продуктов.

Установлено, что использование праймеров HD-1/HD-2, V781/C1256, V1769/C2120, V1769/C2120a и Tyv-2664/Tyv-138 и оптимальных наборов реагентов позволяет выявлять целевой объект при разведении инфекционного экстракта до 10⁻⁴. Несколько менее высокая чувствительность констатирована для праймеров TYLCV-P1F/TYLCV-P1R.

При отработке ПЦР в реальном времени установлено, что праймеры TYLCV-F/TYLCV-R и зонд TYLCV-P [19] характеризуются высокой специфичностью к TYLCV и не реагируют с изолятами других бегомовирусов, включая близкородственный TYLCSV (рис. 6). В экспериментах с пятью различными наборами реагентов для ПЦР-PB и этими праймерами констатирована 100%-я воспроизводимость результатов. Праймеры TYLCV-F/TYLCV-R и зонд TYLCV-P позволяют диагностировать TYLCV при разведении инфекционного экстракта до 10⁻⁶.

Аналогичная специфичность и чувствительность результатов установлена и для коммерческого набора для ПЦР-PB к TYLCV фирмы «Агродиагностика» (Россия). Однако при увеличении термоциклического режима свыше 35 циклов может наблюдаться ложноположительный сигнал с близкородственным TYLCSV.

The following begomovirus isolates were used: TYLCV PV-0844, TYLCV-Isr PV-0560, TYLCV + ACMV PV-0588, TYLCSV PV-0596, TYLCSV PV-0561, ToLCNDV PC-1109, ToLCNDV PC-1111, ACMV PC-0873, BGMV PC-0094 (all from DSMZ collection, Germany), TYLCV-g 842, TYLCV Kaz-1 (FGBU “VNIKR”) and TYLCV P-10501202 (Adgen, United Kingdom).

The specificity of the tested primers was evaluated with reference isolates of the following viruses from the DSMZ collection (Germany), which infect plants of solanaceous crops: AMV, APLV, APMoV, INSV, PAMV, PBRSV, PepMV, PLRV, PVM, PVS, PVX, PVY, PYDV, PYV, TBRV, TMV, ToCV, ToRSV, TRSV and TSWV.

Proba-NK (Agrodiagnostika, Russia) and FitoSorb-M (Syntol, Russia) kits were used for purification DNA and RNA of viruses from plant tissues, which were used according to the manufacturer's instructions.

The primers were tested with the PCR kits indicated in Table 1. The kits were used according to the manufacturer's instructions.

To develop the diagnosis of begomoviruses, 15 pairs of primers were tested, the characteristics of which are shown in Table 2.

In addition, a RT-PCR kit for detection of TYLCV (Agrodiagnostika, Russia) was used as a confirmation test. The nucleotide sequences included in this set of primers and probe sequence are not disclosed by the manufacturer.

RESEARCH RESULTS

A summary of the results of the experiments to develop the diagnosis of begomoviruses is presented in Table 3.

It has been established that universal primers Gemini-A146/Gemini-A672 [7] react with isolates of begomoviruses TYLCV, TYLCSV and ToLCNDV common in Europe and can be used for screening tests for these begomoviruses. No response has been noted for these primers with ACMV (African cassava mosaic virus) and BGMV (Bean golden mosaic virus) begomoviruses. However, due to the formation of non-specific products, the need for further testing with these primers has been stated.

The duplex reaction of primers TY1/TY2 [2] and TYLCV-Sar/TYLCV-Is [21] with TYLCV and TYLCSV has been confirmed, along with the absence of their reaction with ToLCNDV, ACMV and BGMV (Fig. 4). Possibility of use of these primers with various kits of reagents for conventional PCR of domestic manufacturers is established at high enough level of sensitivity of tests (multiplication of an infectious extract in 10⁻³–10⁻⁴). It is noted that primers TY1/TY2 and TYLCV-Sar/TYLCV-Is can be recommended for screening tests for TYLCV and

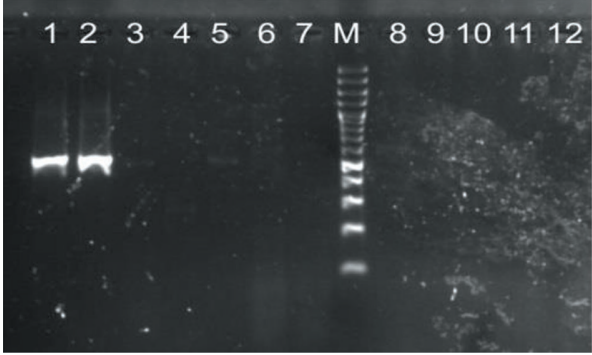


Рис. 7. Выявление TYLCSV методом классической ПЦР с использованием праймеров MA115/MA116 (специфический продукт 552 п. н.) (Monci et al., 2002) [15]

1 TYLCSV PV-0561 (DSMZ)	7 ToLCNDV PC-1111 (DSMZ)
2 TYLCSV PC-0596 (DSMZ)	8 BGMV PC-0094 (DSMZ)
3 TYLCV-Isr PC-0560 (DSMZ)	9 ACMV PC-0873 (DSMZ)
4 TYLCV PV-0844 (DSMZ)	10 TYLCV Kaz-1 (ВНИИКР)
5 TYLCV – g842 (ВНИИКР)	11 Отрицательный контроль (вода)
6 ToLCNDV PC-1109 (DSMZ)	12 Листья здорового растения томата

Fig. 7. Detection of TYLCSV by conventional PCR using MA115/MA116 primers (specific product of 552 b. p.). (Monci et al., 2002) [15]

1 TYLCSV PV-0561 (DSMZ)	7 ToLCNDV PC-1111 (DSMZ)
2 TYLCSV PC-0596 (DSMZ)	8 BGMV PC-0094 (DSMZ)
3 TYLCV-Isr PC-0560 (DSMZ)	9 ACMV PC-0873 (DSMZ)
4 TYLCV PV-0844 (DSMZ)	10 TYLCV Kaz-1 (FGBU “VNIKR”)
5 TYLCV – g842 (FGBU “VNIKR”)	11 Negative control (water)
6 ToLCNDV PC-1109 (DSMZ)	12 Leaves of a healthy tomato plant

Праймеры MA-14/MA-15 [18], PsSic-2267/PCRvc-397 [14] и MA115/MA116 [15] были разработаны для специфического выявления TYLCV.

Однако в семи проведенных экспериментах нами не было получено доказательства специфичности праймеров MA-14/MA-15 к TYLCSV, так как помимо реакции с изолятом целевого объекта наблюдалась также амплификация ДНК некоторых изолятов трех других бегомовирусов. Кроме того, воспроизводимость результатов существенно варьировала в зависимости от используемых наборов реагентов.

Испытание праймеров PsSic-2267/PCRvc-397 [14] подтвердило их высокую специфичность к TYLCSV. Неспецифической реакции этих праймеров с другими бегомовирусами не наблюдалось. Констатировано, что для проведения тестов с данными праймерами необходимо предварительное испытание наборов реагентов для ПЦР с целью минимализации образования неспецифических продуктов амплификации.

Оптимальные результаты при отработке диагностики TYLCSV в плане отсутствия каких-либо неспецифических реакций были получены для праймеров MA115/MA116 [15] (рис. 7).

Результаты предварительных экспериментов свидетельствуют о высокой специфичности

TYLCSV с subsequent sequencing of amplification products or the use of specific primers.

The multiplex test with primers TY-209F/TY-575R (specific to TYLCV) and TY-613F/TY-1363R (specific to TYLCSV) [20] for simultaneous identification of TYLCV and TYLCSV was developed. It was found that this test allows to diagnose both monoinfections of TYLCV and TYLCSV, and mixed infection of these viruses (Fig. 5).

Following the results of the conducted experiments high specificity to TYLCV of primers HD-1/HD-2 [9], V781/C1256 [4], V1769/C2120 [4], Tyv-2664/Tyv-138, recommended in the literature [3], and primers TYLCV-P1F/TYLCV-P1R, developed by us, has been established. All these pairs of primers reacted only with isolates of the target object – TYLCV – and did not react with non-target begomoviruses – TYLCSV, ToLCNDV, ACMV and BGMV.

When using different kits of reagents, the highest reproducibility of results was established for primers HD-1/HD-2 and V781/C1256. Reproducibility of results in tests with primers V1769/C2120 and Tyv-2664/Tyv-138 significantly depended on used reagent kits for PCR.

In tests with V1769/C2120 primers and most of the reagent kits under test, the formation of numerous non-specific amplification products (smears) was observed. After the experiments we modified reverse primer C2120 (Table 2), which allowed us to diagnose TYLCV isolates effectively, selectively and with high sensitivity without formation of any non-specific products.

It was found that the use of HD-1/HD-2, V781/C1256, V1769/C2120, V1769/C2120a and Tyv-2664/Tyv-138 primers and optimal PCR kits allowed to identify the target object when diluting an infectious extract up to 10⁻⁴. A slightly lower sensitivity has been noted for TYLCV-P1F/TYLCV-P1R primers.

During qPCR it was found that TYLCV-F/TYLCV-R primers and TYLCV-R probe [19] are highly specific to TYLCV and do not react with isolates of other begomoviruses, including closely related TYLCSV (Fig. 6). In experiments with five different RT-PCR kits and these primers, 100% reproducibility of the results has been established. TYLCV-F/TYLCV-R primers and TYLCV-R probe allow to diagnose TYLCV when diluting an infectious extract up to 10⁻⁶.

Similar specificity and sensitivity of the results is established for the RT-PCR commercial kit for TYLCV (Agrodiagnostika, Russia). However, when the thermocyclic mode is increased above 35 cycles, a false positive signal with closely related TYLCSV may be observed.

The primers MA-14/MA-15 [18], PsSic-2267/PCRvc-397 [14] and MA115/MA116 [15] were developed for specific detection of TYLCSV.

However, in seven experiments we have not obtained evidence of MA-14/MA-15 primers specificity to TYLCSV, because in addition to the reaction with the target object isolate, we also observed DNA amplification of some isolates of three other begomoviruses. In addition, the reproducibility of the results varied significantly depending on the reagent kits used.

The testing of PsSic-2267/PCRvc-397 primers [14] confirmed their high specificity to TYLCSV. No nonspecific reaction of these primers with other

TYLCV-P [19] или использовать коммерческий набор реагентов для ПЦР-ПВ к TYLCV фирмы «Агро-диагностика» (Россия).

Для проведения подтверждающего теста на наличие TYLCV использовать одну из следующих пар праймеров: HD-1/HD-2 [9], V781/C1256 [4] или V1769/C2120 [4] (в нашей модификации) в формате классической ПЦР.

Для проведения подтверждающего теста на наличие TYLCSV использовать праймеры MA115/MA116 [15] или праймеры TYLCSV-P3F/TYLCSV-P3R (НМОВБ ВНИИКР) в формате классической ПЦР.

Для выявления ToLCNDV использовать праймеры MA1788/MA1789 [12] и ToLCNDV-BF/ToLCNDV-BR [22], детектирующие соответственно ДНК-А и ДНК-В целевого объекта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Accotto G.P., Noris E. Detection methods for TYLCV and TYLCSV / H. Crosnek (ed.). Tomato yellow leaf curl virus disease // Springer. – 2007. – P. 241–249.
 2. Accotto G.P., Navas-Castillo J., Noris E., Moriones E., Louro D. Typing of tomato yellow leaf curl viruses in Europe // European Journal of Plant Pathology. – 2000. – Vol. 106, No. 2. – P. 179–186.
 3. Anfoka G.H., Abhary M.K., Nakhla M.K. Molecular identification of species of the Tomato yellow leaf curl virus complex in Jordan // Journal of Plant Pathology. – 2005. – Vol. 87, No. 1. – P. 65–70.
 4. Atzman G., van Oss H., Czosnek H. PCR amplification of Tomato yellow leaf curl virus DNA from squashes of plants and whitefly vectors: application to the study of TYLCV acquisition and transmission // European Journal of Plant Pathology. – 1998. – Vol. 104, No. 2. – P. 189–194.
 5. Brown J.K., Zerbini F.M., Navas-Castillo J., Moriones E., Ramos-Sobrinho R., Silva J.C.F., Fiallo-Olivé E., Briddon R.W., Hernández-Zepeda C., Idris A., Malathi V.G., Martin D.P., Rivera-Bustamante R., Ueda S., Varsani A. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons // Archives of Virology. – 2015. – Vol. 160. – P. 1593–1619.
 6. CABI, 2020. – URL: <https://www.cabi.org>.
 7. Deng D., McGrath P.F., Robinson D.J., Harrison B.D. Detection and differentiation of whitefly transmitted geminiviruses in plants and vector insects by the polymerase chain reaction with degenerate primers // Annals of Applied Biology. – 1994. – Vol. 125. – P. 327–336.
 8. EFSA, 2011. Scientific opinion on the pest categorisation of Tomato yellow leaf curl virus and related viruses causing tomato yellow leaf curl disease in Europe. EFSA Panel on Plant Health // EFSA Journal. – 2014. – Vol. 12, No. 10. – 27 pp.
 9. El-gaied L.F., Salama M.I., Salem A.M., El-deen A.F., Abdallah A. Molecular and serological studies on a plant virus affecting strawberry // Arab. J. Biotech. – 2008. – Vol. 11. – P. 303–314.
 10. EPPO. Tomato yellow leaf curl and Tomato mottle Begomoviruses. Diagnostics / EPPO Standard PM 7/50 (1) // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2005. – Vol. 35. – P. 319–325.
 11. EPPO Global Database, 2020. – URL: <https://gd.eppo.int>.
 12. Fortes I.M., Sánchez-Campos S., Fiallo-Olivé E., Díaz Pendón J.A., Navas-Castillo J., Moriones E.

use primers TY1/TY2 [2] or primers TYLCV-Sar/TYL-CV-Is [21] with subsequent sequencing of amplification products or multiplex PCR with primers TY-209F/TY-575R and TY-613F/TY-1363R [20].

To conduct screening test for presence of TYLCV one should carry out RT-PCR with primers TYLCV-F/TYL-CV-R and probe TYLCV-R [19] or use a commercial RT-PCR kits for TYLCV (Agrodiagnostika, Russia).

Use one of the following pairs of primers to perform a confirmation test for TYLCV: HD-1/HD-2 [9], V781/C1256 [4] or V1769/C2120 [4] (modified by us) in conventional PCR format.

Use the MA115/MA116 primers [15] or the TYLCSV-P3F/TYLCSV-P3R primers (Research and Methodology Department for Virology and Bacteriology of FGBU “VNIKR”) in conventional PCR format to perform the TYLCSV confirmation test.

To identify ToLCNDV, use primers MA1788/MA1789 [12] and ToLCNDV-BF/ToLCNDV-BR [22] detecting DNA-A and DNA-B target objects respectively.

REFERENCES

1. Accotto G.P., Noris E. Detection methods for TYLCV and TYLCSV. H. Crosnek (ed.). Tomato yellow leaf curl virus disease. *Springer*. 2007: 241–249.
 2. Accotto G.P., Navas-Castillo J., Noris E., Moriones E., Louro D. Typing of tomato yellow leaf curl viruses in Europe. *European Journal of Plant Pathology*. 2000; 106 (2): 179–186.
 3. Anfoka G.H., Abhary M.K., Nakhla M.K. Molecular identification of species of the Tomato yellow leaf curl virus complex in Jordan. *Journal of Plant Pathology*. 2005; 87 (1): 65–70.
 4. Atzman G., van Oss H., Czosnek H. PCR amplification of Tomato yellow leaf curl virus DNA from squashes of plants and whitefly vectors: application to the study of TYLCV acquisition and transmission. *European Journal of Plant Pathology*. 1998; 104 (2): 189–194.
 5. Brown J.K., Zerbini F.M., Navas-Castillo J., Moriones E., Ramos-Sobrinho R., Silva J.C.F., Fiallo-Olivé E., Briddon R.W., Hernández-Zepeda C., Idris A., Malathi V.G., Martin D.P., Rivera-Bustamante R., Ueda S., Varsani A. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of Virology*. 2015; 160: 1593–1619.
 6. CABI, 2020. URL: <https://www.cabi.org>.
 7. Deng D., McGrath P.F., Robinson D.J., Harrison B.D. Detection and differentiation of whitefly transmitted geminiviruses in plants and vector insects by the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Annals of Applied Biology*. 1994; 125: 327–336.
 8. EFSA, 2011. Scientific opinion on the pest categorisation of Tomato yellow leaf curl virus and related viruses causing tomato yellow leaf curl disease in Europe. EFSA Panel on Plant Health. *EFSA Journal*. 2014; 12 (10).
 9. El-gaied L.F., Salama M.I., Salem A.M., El-deen A.F., Abdallah A. Molecular and serological studies on a plant virus affecting strawberry. *Arab. J. Biotech*. 2008; 11: 303–314.
 10. EPPO. Tomato yellow leaf curl and Tomato mottle Begomoviruses. Diagnostics. EPPO Standard PM 7/50 (1) / *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 2005; 35: 319–325.

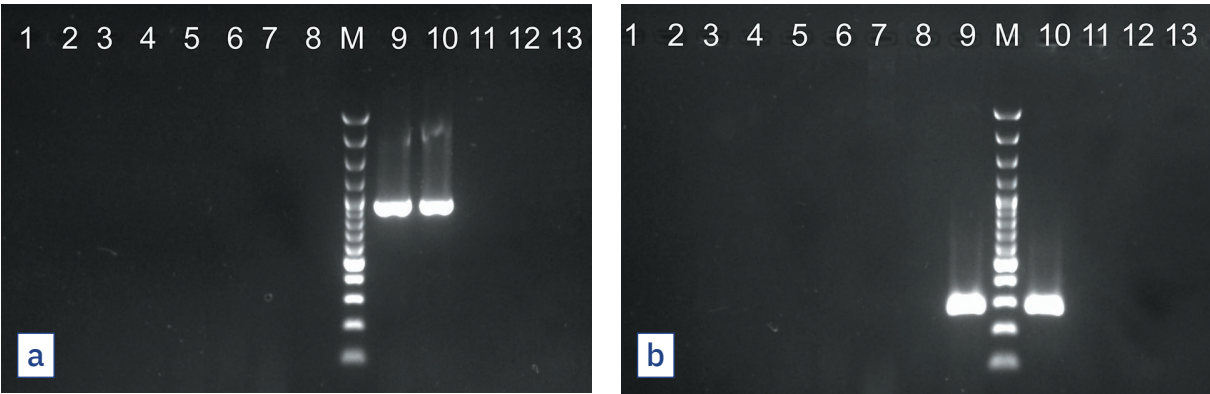


Рис. 8. Выявление ToLCNDV методом классической ПЦР с использованием праймеров ToLCNDV-BF/ToLCNDV-BR (Ruiz et al., 2015) [22] и MA1788/MA1789 (Fortes et al., 2016) [12] (набор реагентов Screen Mix-HS):
 а – праймеры ToLCNDV-BF/ToLCNDV-BR (специфический продукт 891 п. н.);
 б – праймеры MA1788/MA1789 (специфический продукт 269 п. н.)
 Образцы:

1 TYLCV-Isr PC-0560 (DSMZ)	8 ACMV PC-0873 (DSMZ)
2 TYLCV PV-0844 (DSMZ)	9 ToLCNDV PC-1109 (DSMZ)
3 TYLCV P-10501202 (Adgen)	10 ToLCNDV PC-1111 (DSMZ)
4 TYLCV – g842 (ВНИИКР)	11 BGMV PC-0094 (DSMZ)
5 TYLCSV PV-0561 (DSMZ)	12 Отрицательный контроль (Adgen)
6 TYLCSV PC-0596 (DSMZ)	13 Отрицательный контроль (вода)
7 TYLCV+ACMV PV-0588 (DSMZ)	

к TYLCSV разработанных нами праймеров TYLCSV-P2F/TYLCSV-P2R и TYLCSV-P3F/TYLCSV-P3R. Установлена также возможность использования праймеров TYLCSV-P3F/TYLCSV-P3R и TYLCV-P1F/TYLCV-P1R для проведения мультиплексного теста на наличие TYLCSV и TYLCV.

Проведенные эксперименты подтвердили высокую специфичность к ToLCNDV праймеров ToLCNDV-BF/ToLCNDV-BR [22] и MA1788/MA1789 [12] (рис. 8). Эти праймеры реагировали лишь с изолятами целевого агента и не проявляли неспецифических реакций с изолятами других нецелевых бегомовирусов. Констатирована возможность эффективного использования этих праймеров с наборами реагентов для ПЦР различных отечественных и зарубежных фирм-производителей.

Для всех изучаемых праймеров не отмечено неспецифической реакции с различными вирусами, заражающими растения томата, перца и других пасленовых культур: AMV, APLV, APMoV, INSV, PAMV, PBRSV, PepMV, PLRV, PVM, PVS, PVX, PVY, PYDV, PYV, TBRV, TMV, ToCV, ToRSV, TRSV и TSWV.

Проведенные исследования позволяют сделать следующие рекомендации:

Для проведения скринингового теста на наличие TYLCV и TYLCSV в формате классической ПЦР использовать праймеры TY1/TY2 [2] или праймеры TYLCV-Sar/TYLCV-Is [21] с последующим секвенированием продуктов амплификации либо мультиплексную ПЦР с праймерами TY-209F/TY-575R и TY-613F/TY-1363R [20].

Для проведения скринингового теста на наличие TYLCV проводить ПЦР в реальном времени с праймерами TYLCV-F/TYLCV-R и зондом

Fig. 8. Identification of ToLCNDV by conventional PCR using ToLCNDV-BF/ToLCNDV-BR primers (M. Ruiz et al., 2015) [22] and MA1788/MA1789 (I. Fortes et al., 2016) [12] (Screen Mix-HS kit):
 а – ToLCNDV-BF/ToLCNDV-BR primers (specific product of 891 b. p.);
 б – primers MA1788/MA1789 (specific product of 269 b. p.)
 Samples:

1 TYLCV-Isr PC-0560 (DSMZ)	8 ACMV PC-0873 (DSMZ)
2 TYLCV PV-0844 (DSMZ)	9 ToLCNDV PC-1109 (DSMZ)
3 TYLCV P-10501202 (Adgen)	10 ToLCNDV PC-1111 (DSMZ)
4 TYLCV – g842 (FGBU “VNIKR”)	11 BGMV PC-0094 (DSMZ)
5 TYLCSV PV-0561 (DSMZ)	12 Negative control (Adgen)
6 TYLCSV PC-0596 (DSMZ)	13 Negative control (water)
7 TYLCV+ACMV PV-0588 (DSMZ)	

begomoviruses was observed. It was found that for tests with these primers it is necessary to pre-test the PCR kits in order to minimize the formation of non-specific amplification products.

Optimal results of TYLCSV diagnostic testing in terms of absence of any nonspecific reactions were obtained for primers MA115/MA116 [15] (Fig. 7).

The results of preliminary experiments show high specificity of TYLCSV primers TYLCSV-P2F/TYLCSV-P2R and TYLCSV-P3F/TYLCSV-P3R which were developed by us. The possibility to use primers TYLCSV-P3F/TYLCSV-P3R and TYLCV-P1F/TYLCV-P1R for multiplex test on presence of TYLCSV and TYLCV is also established.

The conducted experiments have confirmed high specificity of primers ToLCNDV-BF/ToLCNDV-BR [22] and MA1788/MA1789 [12] to ToLCNDV (Fig. 8). These primers reacted only with isolates of the target agent and did not show non-specific reactions with isolates of other non-targeted begomoviruses. The possibility to effectively use these primers with PCR kits of various domestic and foreign manufacturers has been established.

For all the primers tested there was no non-specific reaction with different viruses infecting tomato, pepper and other solanaceous plants: AMV, APLV, APMoV, INSV, PAMV, PBRSV, PepMV, PLRV, PVM, PVS, PVX, PVY, PYDV, PYV, TBRV, TMV, ToCV, ToRSV, TRSV and TSWV.

The following recommendations can be made:
 To conduct a screening test for TYLCV and TYLCSV in the format of conventional PCR one should

A novel strain of Tomato leaf curl New Delhi virus has spread to the Mediterranean basin // *Viruses*. – 2016. – Vol. 8, No. 307. – DOI: 10.3390/v8110307.

13. Garcia-Andres S., Monci F., Navas-Castillo J., Moriones E. Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature // *Virology*. – 2006. – Vol. 350, No. 2. – P. 433–442.

14. Gorsane F., Gharsallah-Chouchene S., Nakhla M.K., Fekih-Hassan I., Maxwell D.P., Marrakchi M., Fakhfakh H. Simultaneous and rapid differentiation of members of the Tomato yellow leaf curl virus complex by multiplex PCR // *Journal of Plant Pathology*. – 2005. – Vol. 87, No. 1. – P. 43–48.

15. Monci F., Sánchez-Campos S., Navas-Castillo J., Moriones E. A natural recombinant between the geminiviruses Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato yellow leaf curl exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations // *Virology*. – 2002. – Vol. 303, No. 2. – P. 317–326.

16. Navas-Castillo J., Sánchez-Campos S., Díaz J.A., Sáez-Alonso E., Moriones E. First report of Tomato yellow leaf curl virus Is in Spain: coexistence of two different geminiviruses in the same epidemic outbreak // *Plant Disease*. – 1997. – Vol. 81, No. 12. – P. 1461.

17. Navas-Castillo J., Sánchez-Campos S., Díaz J.A., Sáez-Alonso E., Moriones E. Tomato yellow leaf curl virus-IS causes a novel disease of common bean and severe epidemics in tomato in Spain // *Plant Disease*. – 1999. – Vol. 83, No. 1. – P. 29–32.

18. Navas-Castillo J., Sánchez-Campos S., Noris E., Louro D., Accotto G.P., Moriones E. Natural recombination between Tomato yellow leaf curl virus-Is and Tomato leaf curl virus // *Journal of General Virology*. – 2000. – Vol. 81. – P. 2797–2801.

19. Papayiannis L.C., Katis N.I., Idris A.M., Brown J.K. Identification of weed hosts of Tomato yellow leaf curl virus in Cyprus // *Plant Disease*. – 2011. – Vol. 95, No. 2. – P. 120–125.

20. Pellegrin F., Mnari-Hattab M., Tahiri A., Dal-leau-Clouet C., Peterschmitt M., Bonato O. First report of simultaneous presence of Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato yellow leaf curl Israel virus infecting crops and weeds in Tunisia // *Journal of Plant Pathology*. – 2008. – Vol. 90, No. 1. – P. 145.

21. Pico B., Díez M. J., Nuez F. Improved diagnostic techniques for Tomato yellow leaf curl virus in tomato breeding programs // *Plant Disease*. – 1999. – Vol. 83, No. 11. – P. 1006–1012.

22. Ruiz M.L., Simón A., Velasco L., García M.C., Janssen D. First report of Tomato leaf curl New Delhi virus infecting tomato in Spain // *Plant Disease*. – 2015. – Vol. 99, No. 6. – P. 894. – URL: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-14-1072-PDN>.

11. EPPO Global Database, 2020. URL: <https://gd.eppo.int>.

12. Fortes I.M., Sánchez-Campos S., Fiallo-Olivé E., Díaz Pendón J.A., Navas-Castillo J., Moriones E. A novel strain of Tomato leaf curl New Delhi virus has spread to the Mediterranean basin. *Viruses*. 2016; 8 (307). DOI: 10.3390/v8110307.

13. Garcia-Andres S., Monci F., Navas-Castillo J., Moriones E. Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. *Virology*. 2006; 350 (2): 433–442.

14. Gorsane F., Gharsallah-Chouchene S., Nakhla M.K., Fekih-Hassan I., Maxwell D.P., Marrakchi M., Fakhfakh H. Simultaneous and rapid differentiation of members of the Tomato yellow leaf curl virus complex by multiplex PCR. *Journal of Plant Pathology*. 2005; 87 (1): 43–48.

15. Monci F., Sánchez-Campos S., Navas-Castillo J., Moriones E. A natural recombinant between the geminiviruses Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato yellow leaf curl exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish population. *Virology*. 2002; 303 (2): 317–326.

16. Navas-Castillo J., Sánchez-Campos S., Díaz J.A., Sáez-Alonso E., Moriones E. First report of Tomato yellow leaf curl virus Is in Spain: coexistence of two different geminiviruses in the same epidemic outbreak. *Plant Disease*. 1997; 81 (12): 1461.

17. Navas-Castillo J., Sánchez-Campos S., Díaz J.A., Sáez-Alonso E., Moriones E. Tomato yellow leaf curl virus-IS causes a novel disease of common bean and severe epidemics in tomato in Spain. *Plant Disease*. 1999; 83 (1): 29–32.

18. Navas-Castillo J., Sánchez-Campos S., Noris E., Louro D., Accotto G.P., Moriones E. Natural recombination between Tomato yellow leaf curl virus-Is and Tomato leaf curl virus. *Journal of General Virology*. 2000; 81: 2797–2801.

19. Papayiannis L.C., Katis N.I., Idris A.I., Brown J.K. Identification of weed hosts of Tomato yellow leaf curl virus in Cyprus. *Plant Disease*. 2011; 95 (2): 120–125.

20. Pellegrin F., Mnari-Hattab M., Tahiri A., Dal-leau-Clouet C., Peterschmitt M., Bonato O. First report of simultaneous presence of Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato yellow leaf curl Israel virus infecting crops and weeds in Tunisia. *Journal of Plant Pathology*. 2008; 90 (1): 145.

21. Pico B., Díez M.J., Nuez F. Improved diagnostic techniques for Tomato yellow leaf curl virus in tomato breeding programs. *Plant Disease*. 1999; 83 (11): 1006–1012.

22. Ruiz M.L., Simón A., Velasco L., García M.C., Janssen D. First report of Tomato leaf curl New Delhi virus infecting tomato in Spain. *Plant Disease*. 2015; 99 (6): 894. URL: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-14-1072-PDN>.

УДК 632.731

Материалы к познанию фауны трипсов (Thysanoptera) Вьетнама по результатам экспедиции ФГБУ «ВНИИКР»

С.В. ПОУШКОВА, агроном Испытательной лаборатории Ростовского филиала ФГБУ «ВНИИКР», e-mail: posvet0578@gmail.com
 Д.Г. КАСАТКИН, к. б. н., старший научный сотрудник Ростовского филиала ФГБУ «ВНИИКР», e-mail: dorcadion@yandex.ru

Аннотация. В ходе научно-исследовательской экспедиции в Социалистическую Республику Вьетнам, предпринятой с целью сбора коллекционного и справочного материала по карантинным и прочим вредным видам насекомых и растений, был собран материал, включающий 14 видов трипсов. Приведены данные о распространении, биологии обнаруженных видов трипсов, их краткая морфологическая характеристика. Выявлены 5 видов трипсов, имеющих фитосанитарное значение для РФ, а также 6 видов, ранее не регистрировавшихся в фауне Вьетнама.
Ключевые слова. Вьетнам, Thysanoptera, трипсы, карантинные объекты, новые данные, распространение.

ВВЕДЕНИЕ
 июне – июле 2019 года сотрудники ФГБУ «ВНИИКР» Д.Г. Касаткин и Ю.Ю. Кулакова находились в научно-исследовательской экспедиции на территории Социалистической Республики Вьетнам. Цель экспедиции состояла в сборе коллекционного и справочного материала по карантинным и прочим вредным видам насекомых и растений.
 Вьетнам является важным торговым партнером Российской Федерации. В 2018 году товарооборот России с Вьетнамом составил 6 млрд долл. США. Экспорт России во Вьетнам в 2018 году составил 2,5 млрд долл. США. Импорт России из Вьетнама в 2018 году составил 3,6 млрд долл. США. В структуре

UDC 632.731

Materials to the knowledge of the fauna of thrips (Thysanoptera) in Vietnam as a result of the expedition of FGBU “VNIIKR”

S.V. POUSHKOVA, Agronomist of the Testing Laboratory of Rostov Branch of FGBU “VNIIKR”, e-mail: posvet0578@gmail.com
 D.G. KASATKIN, PhD in Biology, Senior Researcher of the Rostov Branch of FGBU “VNIIKR”, e-mail: dorcadion@yandex.ru

Abstract. During a research expedition to the Socialist Republic of Vietnam, undertaken to collect quarantine and other insect pests and weeds, material including 14 species of thrips was collected. Data on the distribution, biology of collected thrips species and their brief morphological characteristics are presented. Five species of thrips, which are of phytosanitary importance for Russia, as well as six species that have not been previously registered in the fauna of Vietnam, were identified.
Keywords. Vietnam, Thysanoptera, thrips, quarantine objects, new data, distribution.

INTRODUCTION
 In June – July 2019, employees of FGBU “VNIIKR” D.G. Kasatkin and Yu.Yu. Kulakova were on a research expedition in the Socialist Republic of Vietnam. The purpose of the expedition was to collect reference and collection material on quarantine and other harmful species of insects and plants.

Vietnam is an important trade partner of the Russian Federation. In 2018, Russia’s trade turnover with Vietnam was USD 6 billion. Russian Federation’s