

Вирус некроза побегов хризантемы (Chrysanthemum stem necrosis virus): распространенность, биология, методы диагностики

О.Н. КОРНИЛАЕВА¹, О.О. БЕЛОШАПКИНА², Ю.Н. ПРИХОДЬКО³

^{1,3} ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия

² ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», г. Москва, Россия

¹ ORCID 0000-0003-1276-6997,
e-mail: morozova-510@yandex.ru

² ORCID 0000-0002-8564-8142,
e-mail: beloshapkina58@mail.ru

³ e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Вирус некроза побегов хризантемы Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV), распространенный в Южной Корее, Бразилии, Иране и Японии, при сильном заражении вызывает отмирание растений-хозяев, основными из которых являются хризантема крупноцветковая и томат. К эффективным переносчикам вируса относятся калифорнийский и томатный трипсы. Существует реальная опасность интродукции и широкой акклиматизации данного вируса как в теплицах, так и в открытом грунте в южных регионах Российской Федерации, что вызывает необходимость его достоверной диагностики лабораторными методами. Экспериментально на базе ВНИИКР доказано, что метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени оказался более чувствительным методом по сравнению с классической ПЦР. В проанализированных методом ПЦР образцах растений хризантемы из нескольких оранжерейных хозяйств вирус некроза побегов хризантемы не был обнаружен.

Ключевые слова. Растение-хозяин, род *Tospovirus*, CSNV, биологические и структурные особенности, ПЦР.

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия во многих странах мира промышленное цветоводство является наиболее динамично развивающейся отраслью растениеводства. Среди цветочных культур хризантема занимает 2-е место в мире по объемам

Chrysanthemum stem necrosis virus: area, biology, diagnosis methods

O.N. KORNILAEVA¹, O.O. BELOSHAPKINA², YU.N. PRIKHODKO³

^{1,3} FGBU "All-Russian Plant Quarantine Center" (FGBU "VNIICR"), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia

² Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

¹ ORCID 0000-0003-1276-6997,
e-mail: morozova-510@yandex.ru

² ORCID 0000-0002-8564-8142,
e-mail: beloshapkina58@mail.ru

³ e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru

ABSTRACT

Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV), common in South Korea, Brazil, Iran and Japan, with a strong infection causes the death of host plants, the main of which are *Dendranthema x grandiflorum* and tomato. Effective vectors of the virus are western flower thrips and tomato thrips. There is a real risk of introduction and massive adaptation of this virus both in greenhouses and open ground in the southern regions of the Russian Federation, which accounts for the necessity of its reliable diagnosis by laboratory methods. FGBU "VNIICR" has experimentally proved that the method of polymerase chain reaction in real time (RT-PCR) turned out to be a more sensitive method compared to classical PCR. Chrysanthemum stem necrosis virus was not detected in chrysanthemum plant samples from several greenhouse farms analyzed by PCR.

Key words. Host plant, genus *Tospovirus*, CSNV, biological and structural features, PCR.

INTRODUCTION

Over the last decades, industrial floriculture has been the most dynamically developing branch of plant growing in many countries. Among flower crops, chrysanthemum ranks second in the world in terms of flower trade (12%) after rose (30%), being a popular and commercially profitable crop both for growing in open

торговли цветами (12%) после розы (30%), являясь популярной и коммерчески выгодной культурой как для выращивания в открытом грунте, так и для выгонки в теплицах (Кошкин и др., 2012). Хризантему, как и большинство цветочно-декоративных культур, размножают вегетативным способом, что может приводить к случаям массового тиражирования и широкого распространения клонов, зараженных различными системными возбудителями болезней, в том числе и опасными вирусами.

Одним из таких патогенов является вирус некроза побегов хризантемы *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), который при сильном поражении способен вызывать отмирание растений восприимчивых сортов, что приводит к значительным экономическим потерям. Этот вирус был впервые описан в середине 90-х гг. XX века в штате Сан-Паулу, Бразилия, где широко распространился на хризантеме крупноцветковой (de Oliveira et al., 2012). Затем о выявлении этого вируса в растениях хризантемы с симптомами некроза побегов было сообщено из Нидерландов (Takeshita et al., 2011). Вирус входит в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза и является отсутствующим на территории ЕАЭС. Диагностика отсутствующих видов должна быть хорошо отработанной, и необходимо использовать высокочувствительные и специфичные методы (Морозова и др., 2017).

В Российскую Федерацию из стран Южной Америки ежегодно импортируются сотни тысяч растений хризантемы, ввиду чего существует реальная опасность интродукции и широкой акклиматизации вируса некроза побегов хризантемы как в теплицах, так и в открытом грунте в южных регионах нашей страны.

Основным растением – хозяином CSNV является хризантема крупноцветковая (*Dendranthema x grandiflorum*) (Bezerra et al., 1999; Takeshita et al., 2011).

CSNV вызывает у растений хризантемы некрозы побегов, хлоротические и/или некротические пятна и кольца на листьях, увядание листьев и побегов, некрозы на цветоножках и цветоложах. Некрозы на побегах могут иметь вид штрихов, полос или пятен. Некрозы на листьях могут быть окружены участками хлоротизированной ткани (EPPO, 2005).

В Бразилии и Японии CSNV распространен также на томате (*Lycopersicon esculentum*) (de Oliveira et al., 2012; Logemann et al., 1987). Имеются сообщения о выявлении этого вируса на гербере (*Gerbera* sp.) в Словении (King et al., 2012), астре китайской (*Callistephus chinensis*) и эустоме крупноцветковой, или лизиантусе Рассела (*Eustoma grandiflorum*), в Японии (Logemann et al., 1987). В Бразилии CSNV был также выявлен в смешанной инфекции с другими тосповирусами – Tomato spotted wilt virus (TSWV), Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV) и/или Groundnut ringspot virus (GRSV) на растениях эустомы *Eustoma grandiflorum*, каллистепфуса *Callistephus* sp. и крестовника кровавого *Senecio cruentus* (Alexandre et al., 1999).

При искусственном заражении данный вирус инфицирует также баклажан *Solanum melongena*, перец *Capsicum annuum*, физалис *Physalis occidentalis*, огурец *Cucumis sativus*, тыкву *Cucurbita pepo*,

ground and greenhouses (Koshkin et al., 2012). *Chrysanthemum*, like most flower and ornamental crops, is propagated vegetatively, which can lead to cases of mass replication and widespread distribution of clones infected with various systemic pathogens, including dangerous viruses.

One of such pathogens is *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), which, with severe damage, can cause the death of plants of susceptible varieties, which leads to significant economic losses. This virus was first described in the mid-1990s in the state of São Paulo, Brazil, where it spread widely on the large-flowered chrysanthemum (de Oliveira et al., 2012). Then, the detection of this virus in chrysanthemum plants with symptoms of stem necrosis was reported from the Netherlands (Takeshita et al., 2011). The virus is included in the Common List of Quarantine Objects of the Eurasian Economic Union (EAEU) and is absent in the EAEU. Diagnostics of absent species should be well developed, and highly sensitive and specific methods should be used (Morozova et al., 2017).

Hundreds of thousands of chrysanthemum plants are annually imported into the Russian Federation from the countries of South America, which is why there is a real danger of the introduction and massive adaptation of the chrysanthemum stem necrosis virus both in greenhouses and in the open field in the southern regions of Russia.

The main host plant of CSNV is *Dendranthema x grandiflorum* (Bezerra et al., 1999; Takeshita et al., 2011).

CSNV causes necrosis of stems in chrysanthemum plants, chlorotic and/or necrotic spots and rings on leaves, wilting of leaves and shoots, necrosis on pedicels and receptacles. Stem necrosis may appear as streaks, stripes or spots. Leaf necrosis may be surrounded by areas of chlorotic tissue (EPPO, 2005).

In Brazil and Japan, CSNV is also spread on tomato (*Lycopersicon esculentum*) (de Oliveira et al., 2012; Logemann et al., 1987). There are reports of the detection of this virus on gerbera (*Gerbera* sp.) in Slovenia (King et al., 2012), China aster (*Callistephus chinensis*) and lisianthus (*Eustoma grandiflorum*), in Japan (Logemann et al., 1987). In Brazil, CSNV was also detected in a mixed infection with other tospoviruses – Tomato spotted wilt virus (TSWV), Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV) and/or Groundnut ringspot virus (GRSV) on *Eustoma grandiflorum*, *Callistephus* sp. and *Senecio cruentus* (Alexandre et al., 1999).

When artificially infected, this virus also affects eggplant *Solanum melongena*, pepper *Capsicum annuum*, physalis *Physalis occidentalis*, cucumber *Cucumis sativus*, pumpkin *Cucurbita pepo*, lettuce *Lactuca sativa*, spinach *Spinacia oleracea*, beans *Phaseolus vulgaris*, cowpeas *Vigna unguiculata*, peas *Pisum sativum*, thorn apple *Datura stramonium*, different tobacco species – *Nicotiana benthamiana*, *N. occidentalis*, *N. rustica*, *N. tabacum*, apple-of-Peru *Nicandra physalodes*, common zinnia *Zinnia elegans* and others (Bezerra et al., 1999; Logemann et al., 1987; Takeshita et al., 2011). All these plants can be considered as potential host plants of CSNV.

салат *Lactuca sativa*, шпинат *Spinacia oleracea*, фасоль *Phaseolus vulgaris*, вигну *Vigna unguiculata*, горох *Pisum sativum*, дурман *Datura stramonium*, разные виды табака – *Nicotiana benthamiana*, *N. occidentalis*, *N. rustica*, *N. tabacum*, никандру *Nicandra physalodes*, циннию *Zinnia elegans* и некоторые другие (Bezerra et al., 1999; Logemann et al., 1987; Takeshita et al., 2011). Все эти растения можно рассматривать в качестве потенциальных хозяев CSNV.

В настоящее время, по данным ЕОКЗР, вирус распространен в Южной Корее, Бразилии, Иране и Японии (EPPO, 2021; Wu et al., 2014). Встречался он и в некоторых европейских странах (Нидерландах, Великобритании, Словении, Бельгии), где растения хризантемы для закладки маточных насаждений были ввезены из Бразилии, но поскольку очаги вируса во всех этих странах были ликвидированы, сейчас CSNV считается отсутствующим в Европе (Eiras et al., 2001; Wu et al., 2014).

CSNV на основании строения генома относится к роду *Orthotospovirus*, типовым представителем которого является вирус пятнистого увядания томата TSWV (Jafarpour et al., 2010). CSNV входит в американскую ветвь ортотосповирусов, которые отличаются от азиатских по наличию триады аминокислот (RGD) в гене, кодирующем гликопротеин Gc (Mumford et al., 1996).

Вирионы CSNV представляют собой округлые или плеоморфные частицы диаметром 75–120 нм, на поверхности которых имеются выступы длиной 5–10 нм (de Oliveira et al., 2012).

В вирионах содержится 58–79% белка, 20–30% липидов, 2–7% углеводов и 1–2% РНК. Вирус размножается в цитоплазме клеток. Созревание вирионов происходит почкованием в пузырьках аппарата Гольджи и цистернах эндоплазматического ретикулума (Bucher et al., 2003).

Молекулы геномной РНК энкапсидированы нуклеопротеином, образуя рибонуклеопротеиновый комплекс, покрытый липопротеиновой оболочкой. Геном состоит из трех различных по размерам молекул односпиральной кольцевой РНК, обозначаемых как L, M и S, которые состоят из 8960, 4828 и 2949 нуклеотидов соответственно. РНК-L кодирует белок L (РНК-зависимую

At present, according to EPPO, the virus is common in South Korea, Brazil, Iran and Japan (EPPO, 2021; Wu et al., 2014). It was also reported in some European countries (the Netherlands, Great Britain, Slovenia, Belgium), where chrysanthemum plants for laying uterine plantings were imported from Brazil, but since the outbreaks of the virus in all these countries have been eliminated, CSNV is now considered absent in Europe (Eiras et al., 2001; Wu et al., 2014).

Based on the genome structure, CSNV belongs to the genus *Orthotospovirus*, a typical representative of which is TSWV (Jafarpour et al., 2010). CSNV belongs to the American branch of orthotospoviruses, which differ from the Asian ones in the presence of the amino acid triad (RGD) in the gene encoding the glycoprotein Gc (Mumford et al., 1996).

CSNV virions are round or pleomorphic particles with a diameter of 75–120 nm, on the surface of which there are protrusions 5–10 nm long (de Oliveira et al., 2012).

Virions contain 58–79% protein, 20–30% lipids, 2–7% carbohydrates, and 1–2% RNA. The virus multiplies in the cytoplasm of cells. Maturation of virions occurs by budding in the vesicles of the Golgi apparatus and cisterns of the endoplasmic reticulum (Bucher et al., 2003).

Genomic RNA molecules are encapsulated by a nucleoprotein, forming a ribonucleoprotein complex covered with a lipoprotein envelope. The genome consists of three single-stranded circular RNA molecules of different sizes, designated L, M, and S, which consist of 8960, 4828, and 2949 nucleotides, respectively. RNA-L encodes protein L (RNA-dependent RNA polymerase), which is associated with viral transcription and replication (Bucher et al., 2003). RNA-M contains a glycoprotein precursor encoding 2 glycoproteins (Gn and Gc), which are responsible for a specific relationship with cellular receptors in the organism of vectors and intercellular transport of the virus in the host plant (Verhoeven et al., 1996). RNA-S encodes protein N (nucleoprotein, or nucleocapsid), which is responsible for the formation of the structure of virions and regulation of transcription, as well as the non-structural protein NSS, which is an RNA suppressor (Boben et al., 2007). In terms of nucleotide sequence identity on

RNA-S and RNA-M, CSNV is phylogenetically closest to the following tospoviruses: TSWV, Impatiens necrotic spot tospovirus (INSV), Groundnut ringspot virus (GRSV), Tomato chlorotic spot virus (TCSV), Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV), Alstroemeria necrotic streak virus (ANSV) and Melon severe mosaic virus (MSMV) (de Jongle et al., 2013).

CSNV is not transmitted with seeds (Eiras et al., 2001). In nature, this virus is spread by insects of the family Thripidae (Thysanoptera) – western flower thrips *Frankliniella occidentalis*



Рис. 1. Замороженные образцы листьев хризантемы крупноцветковой для выявления CSNV и других тосповирусов (фото авторов)

Fig. 1. Frozen leaf samples of large-flowered chrysanthemum for the detection of CSNV and other tospoviruses (photo by the authors)

РНК-полимеразу), взаимосвязанный с транскрипцией и репликацией вирусов (Bucher et al., 2003). На РНК-М расположен гликопротеиновый прекурсор, кодирующий 2 гликопротеина (Gn и Gc), которые отвечают за специфическую взаимосвязь с клеточными рецепторами в организме переносчиков и межклеточный транспорт вируса в растении-хозяине (Verhoeven et al., 1996). РНК-S кодирует белок N (нуклеопротеин, или нуклеокапсид), ответственный за формирование структуры вирионов и регуляцию транскрипции, а также неструктурный белок NSS, являющийся супрессором РНК (Boben et al., 2007). По идентичности последовательности нуклеотидов на РНК-S и РНК-M CSNV филогенетически наиболее близок к следующим тосповирусам: TSWV, Impatiens necrotic spot tospovirus (INSV), Groundnut ringspot virus (GRSV), Tomato chlorotic spot virus (TCSV), Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV), Alstroemeria necrotic streak virus (ANSV) и Melon severe mosaic virus (MSMV) (de Jongle et al., 2013).

CSNV не передается семенами (Eiras et al., 2001). В природе этот вирус распространяется насекомыми семейства Thripidae (Thysanoptera) – западным цветочным (калифорнийским) трипсом *Frankliniella occidentalis* (Pergande) и томатным трипсом *F. schultzei* Trybom. Повсеместно распространенный табачный трипс *Thrips tabaci* Lindeman, а также трипс Пальма *Thrips palmi* Karny не являются переносчиками этого вируса (Bezerra et al., 1999; Eiras et al., 2001). Вирус приобретают 1-я и 2-я личиночные стадии трипсов в процессе питания на зараженных растениях всего в течение 15–30 мин. питания. Ортотосповирусы размножаются в организме насекомых-переносчиков и сохраняются на протяжении всей их жизни, активно распространяясь через имаго трипсов, но не передаются через яйца.

Для сохранения и размножения изолятов CSNV рекомендуется использовать растения *Nicotiana benthamiana* и *Datura stramonium* (Boben et al., 2007; Mumford et al., 1996; Okuda et al., 2001).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Достоверная диагностика CSNV невозможна без использования современных высокочувствительных методов лабораторной экспертизы. В качестве отборочных используют тесты на растениях-индикаторах, метод иммуноферментного анализа и ПЦР-тест.

В задачи данного исследования входила апробация двух модификаций ПЦР и двух пар праймеров, наборов реагентов для ПЦР различных фирм-производителей, лиофилизированных контрольных образцов растений-накопителей, содержащих изоляты ортотосповирусов, с целью выявления наиболее адаптированных и чувствительных методик.

Поскольку CSNV и другие ортотосповирусы сохраняют инфекционность на протяжении не менее одного года при замораживании при –80 °C (Boben et al., 2007), мы использовали коллекционный материал фирмы DSMZ (Германия), представляющий собой лиофилизированные листья растений-накопителей, содержащие изоляты этих вирусов (рис. 1).

Для выделения РНК CSNV использовали коммерческий набор реагентов для экстракции

(Pergande) and tomato thrips *F. schultzei* Trybom. Widely spread common cotton thrips *Thrips tabaci* Lindeman and palm thrips *Thrips palmi* Karny are not vectors of this virus (Bezerra et al., 1999; Eiras et al., 2001). The virus is acquired by the 1st and 2nd larval stages of thrips in the process of feeding on infected plants for a total of 15–30 minutes nutrition. Orthotospoviruses multiply in the organism of insect vectors and persist throughout their life, actively spreading through the imago of thrips, but not transmitted through eggs.

For the preservation and propagation of CSNV isolates, it is recommended to use plants *Nicotiana benthamiana* and *Datura stramonium* (Boben et al., 2007; Mumford et al., 1996; Okuda et al., 2001).

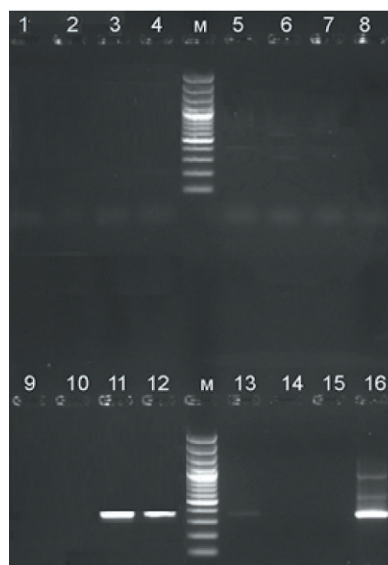


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации при выявлении вируса некроза побегов хризантемы (CSNV) методом классической ПЦР с использованием праймеров CSNVUP1/CSNVLO1 (Boben et al., 2007).

Варианты: 1 – INSV PV-0280; 2 – TSWV PV-0393; 3 – INSV PV-0281; 4 – INSV PV-0485; 5 – TSWV PV-0182; 6 – TSWV PV-0204; 7 – TSWV 07501; 8 – TSWV; 9 – WSMoV¹ PV-0283; 10 – IYSV² PV-0528; 11 – CSNV PV-0529; 12 – CSNV PV-0529 1/10; 13 – CSNV PV-0529 1/100; 14 – CSNV PV-0529 1/1000; 15 – CSNV PV-0529 1/10000; 16 – положительный контроль амплификации (CSNV PV-0529).

Fig. 2. Electrophoretogram of amplification products in the detection of CSNV by classical PCR using primers CSNVUP1/CSNVLO1 (Boben et al., 2007).

Variants: 1 – INSV PV-0280; 2 – TSWV PV-0393; 3 – INSV PV-0281; 4 – INSV PV-0485; 5 – TSWV PV-0182; 6 – TSWV PV-0204; 7 – TSWV 07501; 8 – TSWV; 9 – WSMoV¹ PV-0283; 10 – IYSV² PV-0528; 11 – CSNV PV-0529; 12 – CSNV PV-0529 1/10; 13 – CSNV PV-0529 1/100; 14 – CSNV PV-0529 1/1000; 15 – CSNV PV-0529 1/10000; 16 – positive amplification control (CSNV PV-0529).

¹ WSMoV – Watermelon silver mottle virus.

² IYSV – Iris yellow spot virus.

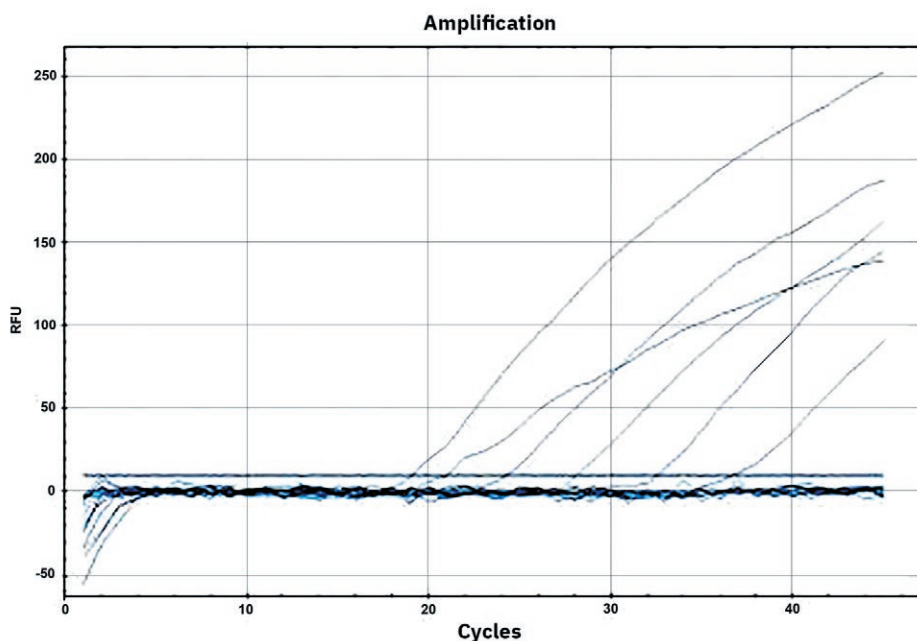


Рис. 3. Графики накопления продуктов амплификации при выявлении вируса некроза побегов хризантемы (CSNV) методом ПЦР в реальном времени с использованием праймеров CSNV-F/CSNV-R и зонда CSNV-MGB (Boben et al., 2007).

Варианты: 1 – INSV PV-0280;
2 – TSWV PV-0393; 3 – INSV PV-0281;
4 – INSV PV-0485; 5 – TSWV PV-0182;
6 – TSWV PV-0204; 7 – TSWV 07501;
8 – TSWV; 9 – WSMoV PV-0283;
10 – IYSV PV-0528; 11 – CSNV PV-0529;
12 – CSNV PV-0529 1/10;
13 – CSNV PV-0529 1/100;
14 – CSNV PV-0529 1/1000;
15 – CSNV PV-0529 1/10000;
16 – положительный контроль амплификации (CSNV PV-0529).

Fig. 3. Charts of the accumulation of amplification products in the detection of CSNV by RT-PCR using primers CSNV-F/CSNV-R and probe CSNV-MGB (Boben et al., 2007).

Variants: 1 – INSV PV-0280;
2 – TSWV PV-0393; 3 – INSV PV-0281;
4 – INSV PV-0485; 5 – TSWV PV-0182;
6 – TSWV PV-0204; 7 – TSWV 07501;
8 – TSWV; 9 – WSMoV PV-0283;
10 – IYSV PV-0528;
11 – CSNV PV-0529;
12 – CSNV PV-0529 1/10;
13 – CSNV PV-0529 1/100;
14 – CSNV PV-0529 1/1000;
15 – CSNV PV-0529 1/10000;
16 – positive amplification control (CSNV PV-0529).

нуклеиновых кислот, изготовленный отечественным производителем ООО «АгроДиагностика». Реакцию обратной транскрипции проводили с универсальным праймером Random dN₆ и обратной транскриптазой MMLV.

Для выявления CSNV методом ПЦР в реальном времени использовали праймеры CSNV-F (5'-TGAATTTGAGGAAGAACAACCA-3'), CSNV-R (5'-CTGATCCAGGTTGTCATTGCA-3) и зонд CSNV-MGB (FAM-TTGCATTCAACTTCC-BHQ1) (Boben et al., 2007), а для классической ПЦР – праймеры CSNVUP1 (5'-AGCTGGTGAAGTTGAATTTGAG-3') и CSNVLO1 (5'-CATTCAAGCTAAGCCCGTATGC-3') (Boben et al., 2007), амплифицирующие участки гена нуклеокапсида величиной 70 п. о. и 357 п. о. соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Работа проводилась в лаборатории вирусологии Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР».

В экспериментах, проведенных методами ПЦР в реальном времени и классической ПЦР, установлена высокая специфичность испытуемых праймеров, так как они реагировали лишь с изолятом целевого объекта и не реагировали с изолятами других ортотосповирусов (рис. 2, 3).

MATERIALS AND METHODS

Reliable diagnosis of CSNV is impossible without the use of modern highly sensitive methods of laboratory examination. Tests on indicator plants, enzyme-linked immunosorbent assay and PCR test are used as qualifying tests.

The objectives of this study included the testing of two PCR modifications and two pairs of primers, sets of reagents for PCR from various manufacturers, lyophilized control samples of storage plants containing orthotospovirus isolates in order to identify the most adapted and sensitive methods.

Since CSNV and other orthotospoviruses remain infectious for at least one year when frozen at -80°C (Boben et al., 2007), we used collection material from DSMZ (Germany), which is lyophilized leaves of storage plants containing isolates of these viruses (Fig. 1).

To isolate CSNV RNA, we used a commercial set of reagents for the extraction of nucleic acids, manufactured by the Russian manufacturer AgroDiagnostica. The reverse transcription reaction was performed with a universal primer Random dN₆ and reverse transcriptase MMLV.

To detect CSNV by RT-PCR, the primers were used CSNV-F (5'-TGAATTTGAGGAAGAACAACCA-3'), CSNV-R (5'-CTGATCCAGGTTGTCATTGCA-3) and probe CSNV-MGB (FAM-TTGCATTCAACTTCC-BHQ1) (Boben et al., 2007), and for classical PCR – the primers CSNVUP1 (5'-AGCTGGTGAAGTTGAATTTGAG-3') and CSNVLO1 (5'-CATTCAAGCTAAGCCCGTATGC-3') (Boben et al., 2007), amplifying regions of the nucleocapsid gene of 70 bp and 357 bp respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

The work was carried out in the Virology Laboratory of the Testing Laboratory Center of FGBU «VNIICR».

In experiments carried out by RT-PCR and classical PCR, a high specificity of the tested primers was established, since they reacted only with the target isolate and did not react with isolates of other orthotospoviruses (Fig. 2, 3).

In subsequent experiments with positive control samples of orthotospoviruses, it was found that RT-PCR is a more sensitive method compared to classical PCR. Thus, the RT-PCR method made it possible to detect CSNV at a cDNA dilution up to

В последующих экспериментах с положительными контрольными образцами ортотосповирусов установлено, что ПЦР в реальном времени является более чувствительным методом по сравнению с классической ПЦР. Так, метод ПЦР в реальном времени позволял выявлять CSNV при разведении кДНК до 1/10000 включительно, тогда как классическая ПЦР – лишь при разведении не более 1/100 (см. таблицу).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

При сравнении методов ПЦР в режиме реального времени и классической ПЦР было установлено, что чувствительность 1-го метода гораздо выше.

Таблица
Определение специфичности
и чувствительности методов ПЦР
в реальном времени и классической
ПЦР в выявлении вируса некроза
побегов хризантемы (CSNV)

№ п/п	Варианты	ПЦР в реальном времени		Классическая ПЦР
		Пороговый цикл	Результат	Результат
1	INSV PV-0280 (DSMZ, Германия)	–	–	–
2	TSWV PV-0393 (DSMZ, Германия)	–	–	–
3	INSV PV-0281 (DSMZ, Германия)	–	–	–
4	INSV PV-0485 (DSMZ, Германия)	–	–	–
5	TSWV PV-0182 (DSMZ, Германия)	–	–	–
6	TSWV PV-0204 (DSMZ, Германия)	–	–	–
7	TSWV 07501 (LOEWE, Германия)	–	–	–
8	TSWV (Adgen, Шотландия)	–	–	–
9	WSMoV PV-0283 (DSMZ, Германия)	–	–	–
10	IYSV PV-0528 (DSMZ, Германия)	–	–	–
11	CSNV PV-0529	19,10	+	+
12	CSNV PV-0529 1/10	24,26	+	+
13	CSNV PV-0529 1/100	28,13	+	+
14	CSNV PV-0529 1/1000	32,51	+	–
15	CSNV PV-0529 1/10000	36,69	+	–
16	Положительный контроль амплификации	21,02	+	+

1/10000 inclusive, while classical PCR – only at a dilution of no more than 1/100 (see Table).

CONCLUSION

When comparing PT-PCR and classical PCR, it was found that the sensitivity of the 1st method is much higher. There was no non-specific reaction of primers CSNV-F, CSNV-R and the CSNV-MGB probe (Boben et al., 2007) and primers CSNVUP1 and CSNVLO1 (Boben et al., 2007) with isolates of non-target tospoviruses TSWV, INSV, IYSV, and WSMoV, which indicates their high specificity for CSNV.

Based on the results of the studies, a method was developed for the detection and identification of

Table
Determination of the specificity
and sensitivity of RT-PCR methods
and classical PCR
in the detection of CSNV

№	Variants	RT-PCR	Classical PCR	
		Threshold cycle	Result	Result
1	INSV PV-0280 (DSMZ, Germany)	–	–	–
2	TSWV PV-0393 (DSMZ, Germany)	–	–	–
3	INSV PV-0281 (DSMZ, Germany)	–	–	–
4	INSV PV-0485 (DSMZ, Germany)	–	–	–
5	TSWV PV-0182 (DSMZ, Germany)	–	–	–
6	TSWV PV-0204 (DSMZ, Germany)	–	–	–
7	TSWV 07501 (LOEWE, Germany)	–	–	–
8	TSWV (Adgen, Scotland)	–	–	–
9	WSMoV PV-0283 (DSMZ, Germany)	–	–	–
10	IYSV PV-0528 (DSMZ, Germany)	–	–	–
11	CSNV PV-0529	19.10	+	+
12	CSNV PV-0529 1/10	24.26	+	+
13	CSNV PV-0529 1/100	28.13	+	+
14	CSNV PV-0529 1/1000	32.51	+	–
15	CSNV PV-0529 1/10000	36.69	+	–
16	Positive amplification control	21.02	+	+

Не отмечено неспецифической реакции праймеров CSNV-F, CSNV-R и зонда CSNV-MGB (Boben et al., 2007) и праймеров CSNVUP1 и CSNVLO1 (Boben et al., 2007) с изолятами нецелевых тосповирусов TSWV, INSV, IYSV и WSMoV, что свидетельствует об их высокой специфичности к CSNV.

По результатам проведенных исследований была разработана методика выявления и идентификации вируса некроза побегов хризантемы, предусматривающая проведение скринингового теста методом ПЦР в реальном времени с праймерами CSNV-F, CSNV-R и зондом CSNV-MGB и подтверждающего теста методом классической ПЦР с праймерами CSNVUP1 и CSNVLO1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кошкин Е., Панфилова О., Пильщикова Н. Качество продукции цветоводства: проблемы и решения. – М.: РГАУ-МСХА, 2012, 16–19.
2. Морозова О., Шнейдер Ю., Приходько Ю., Белошапкина О., 2017. Отработка методов диагностики вирусов некротической пятнистости бальзамина и бронзовости томата в растениях-хозяевах и насекомых-переносчиках. – Карантин растений. Наука и практика, 4 (22): 25–28.
3. Alexandre M., Duarte L., Rivas M., Chagas C., 1999. Mixed infection by Tospovirus species in ornamental crops in Sao Paulo state, Brazil. – *Summa phytopathol*, № 25: 353–356.
4. Bezerra I., de Resende R., Pozzer L., Nagata T., Kormelink R., de Ávila A.C., 1999. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. – *Phytopathology*, № 89: 823–830.
5. Boben J., Mehle N., Pirc M., Mavric Plesko I., Ravnika M., 2007. New molecular diagnostic methods for detection of Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV). – *Acta Biologica Slovenica*, № 50: 41–51.
6. Bucher E., Sijen T., de Haan P., Goldbach R., Prins M., 2003. Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. – *Journal of Virology*, № 77: 1329–1336.
7. De Jongle K., Morio S., Maes M., 2013. First outbreak of Chrysanthemum stem necrotic virus (CSNV) in Belgium. – *New Disease Reports*, № 28: 14–15.
8. De Oliveira A., Melo F., Inoue-Nagata A., Nagata T., Kitajima W., Resende R.O., 2012. Characterization of Bean necrotic mosaic virus: A member of a novel evolutionary lineage within the genus *Tospovirus*. – *Plos ONE*, № 7: 1–9.
9. Eiras M., Resende R., Missiaggia A., de Ávila A., 2001. RT-PCR and dot blot hybridization methods for a universal detection of tospoviruses. – *Fitopatologia Brasileira*, № 26: 170–175.
10. EPPO, 2005. Chrysanthemum stem necrosis tospovirus. Data sheets on quarantine pests. – *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, № 35: 409–412.
11. Jafarpour B., Sabokkhiz M.A., Rastegar M., 2010. First report of CSNV in Iran and occurrence of some viral diseases of ornamental plants in Mashhad region, Iran. – *Petria*, № 20: 67–68.
12. King A., Adams M., Carstens E.B., Lefkowitz E., 2012. Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. – International Union of Microbiological Societies Vd. Elsevier Academic Press. 2012, London, UK. 1327 p.

chrysanthemum stem necrosis virus, which involves a screening test by real-time RT-PCR with primers CSNV-F, CSNV-R and a CSNV-MGB probe and a confirmation test by classical PCR with primers CSNVUP1 and CSNVLO1.

REFERENCES

1. Koshkin E., Panfilova O., Pilshchikova N. Quality of floriculture products: problems and solutions [Kachestvo produktsii tsvetovodstva: problemy i resheniya]. M.: RGAU-MSKHA, 2012; 16–19 (in Russian).
2. Morozova O., Schneider Yu., Prikhodko Yu., Beloshapkina O. Verification of diagnostic methods for impatiens necrotic spot virus and tomato spotted wilt virus in host plants and insect vectors [Otrabotka metodov diagnostiki virusov nekroticheskoy pyatnistosti balzamina i bronzovosti tomata v rasteniyakh-khozyayevakh i nasekomykh-perenoschikakh]. *Plant Health. Research and Practice*, 2017; 4 (22): 25–28 (in Russian).
3. Alexandre M., Duarte L., Rivas M., Chagas C. Mixed infection by Tospovirus species in ornamental crops in Sao Paulo state, Brazil. *Summa phytopathol*, 1999; 25: 353–356.
4. Bezerra I., de Resende R., Pozzer L., Nagata T., Kormelink R., de Ávila A.C. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. *Phytopathology*, 1999; 89: 823–830.
5. Boben J., Mehle N., Pirc M., Mavric Plesko I., Ravnika M. New molecular diagnostic methods for detection of Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV). *Acta Biologica Slovenica*, 2007; 50: 41–51.
6. Bucher E., Sijen T., de Haan P., Goldbach R., Prins M. Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *Journal of Virology*, 2003; 77: 1329–1336.
7. De Jongle K., Morio S., Maes M. First outbreak of Chrysanthemum stem necrotic virus (CSNV) in Belgium. *New Disease Reports*, 2013; 28: 14–15.
8. De Oliveira A., Melo F., Inoue-Nagata A., Nagata T., Kitajima W., Resende R.O. Characterization of Bean necrotic mosaic virus: A member of a novel evolutionary lineage within the genus *Tospovirus*. *Plos ONE*, 2012; 7: 1–9.
9. Eiras M., Resende R., Missiaggia A., de Ávila A. RT-PCR and dot blot hybridization methods for a universal detection of tospoviruses. *Fitopatologia Brasileira*, 2001; 26: 170–175.
10. EPPO. Chrysanthemum stem necrosis tospovirus. Data sheets on quarantine pests. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 2005; 35: 409–412.
11. Jafarpour B., Sabokkhiz M.A., Rastegar M. First report of CSNV in Iran and occurrence of some viral diseases of ornamental plants in Mashhad region, Iran. *Petria*, 2010; 20: 67–68.
12. King A., Adams M., Carstens E.B., Lefkowitz E. Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. International Union of Microbiological Societies Vd. Elsevier Academic Press. 2012, London, UK. 1327 p.

13. Logemann J., Schell J., Willmitzer L., 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. – *Analytical Biochemistry*, № 163: 16–20.
14. Mumford R., Barker I., Wood K., 1996. An improved method for the detection of Tospoviruses using the polymerase chain reaction. – *Journal of Virological Methods*, № 57: 109–115.
15. Okuda M., Hanada K., 2001. RT-PCR for detecting five distinct Tospovirus species using degenerate primers and dsRNA template. – *J. Virol. Methods*, № 96: 149–156.
16. Takeshita M., Nagai N., Okuda M., Matsuura S., Okuda S., Furuya N., Tsuchiya K., 2011. Molecular and biological characterization of Chrysanthemum stem necrosis virus isolates from distinct regions in Japan. – *Eur. J. Plant Pathol*, № 131: 9–14.
17. Verhoeven J., Roenhorst J., Cotes I., Peters D., 1996. Detection of a novel tospovirus in chrysanthemum. – *Acta Horticulturae*, № 432: 44–51.
18. Wu P., Chien W., Okuda M., Takeshita M., Yeh S., Wang Y., Chen T., 2014. Genetic and serological characterization of Chrysanthemum stem necrosis virus, a member of the genus *Tospovirus*. – *Arch. Virology*, № 27: 634–643.
19. EPPO, 2021. EPPO Global Database. – URL: <https://gd.eppo.int> (дата обращения: 12.04.2021).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Корнилаева Ольга Николаевна, научный сотрудник – заведующая лабораторией вирусологии Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; *ORCID 0000-0003-1276-6997*, *e-mail: morozova-510@yandex.ru*.

Белошاپкина Ольга Олеговна, доктор сельскохозяйственных наук, профессор кафедры защиты растений ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», г. Москва, Россия; *ORCID 0000-0002-8564-8142*, *e-mail: beloshapkina58@mail.ru*.

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

13. Logemann J., Schell J., Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry*, 1987; 163: 16–20.

14. Mumford R., Barker I., Wood K. An improved method for the detection of Tospoviruses using the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 1996; 57: 109–115.

15. Okuda M., Hanada K. RT-PCR for detecting five distinct Tospovirus species using degenerate primers and dsRNA template. *J. Virol. Methods*, 2001; 96: 149–156.

16. Takeshita M., Nagai N., Okuda M., Matsuura S., Okuda S., Furuya N., Tsuchiya K. Molecular and biological characterization of Chrysanthemum stem necrosis virus isolates from distinct regions in Japan. *Eur. J. Plant Pathol*, 2011; 131: 9–14.

17. Verhoeven J., Roenhorst J., Cotes I., Peters D. Detection of a novel tospovirus in chrysanthemum. *Acta Horticulturae*, 1996; 432: 44–51.

18. Wu P., Chien W., Okuda M., Takeshita M., Yeh S., Wang Y., Chen T. Genetic and serological characterization of Chrysanthemum stem necrosis virus, a member of the genus *Tospovirus*. *Arch. Virology*, 2014; 27: 634–643.

19. EPPO, 2021. EPPO Global Database. URL: <https://gd.eppo.int> (last accessed: 12.04.2021).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Olga Kornilaeva, researcher, head of Virology Laboratory, Testing Laboratory Center, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; *ORCID 0000-0003-1276-6997*, *e-mail: morozova-510@yandex.ru*.

Olga Beloshapkina, Doctor of Agriculture, professor of the Plant Protection Department, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia; *ORCID 0000-0002-8564-8142*, *e-mail: beloshapkina58@mail.ru*.

Yuriy Prihodko, PhD in Agriculture, leading researcher, Research and Methodology Department for Virology and Bacteriology, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; *e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru*.