Received: 28.01.2021 / Accepted: 15.03.2021

Jednoczesne wykrywanie wirusa mozaiki arbuza (watermelon mosaic virus, WMV) oraz wirusa żółtej mozaiki cukinii (zucchini yellow mosaic virus, ZYMV) za pomocą reakcji dupleks RT-PCR

Simultaneous detection of watermelon mosaic virus (WMV) and zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) using duplex RT-PCR reaction

Julia Minicka^A*, Agnieszka Taberska, Beata Hasiów-Jaroszewska^B

Streszczenie

Wirus mozaiki arbuza (watermelon mosaic virus, WMV) oraz wirus żółtej mozaiki cukinii (zucchini yellow mosaic virus, ZYMV) są groźnymi patogenami infekującymi uprawy roślin dyniowatych na całym świecie. W Polsce występują powszechnie, szczególnie w uprawach cukinii, powodując straty w jakości i ilości plonów. Celem pracy było opracowanie i zoptymalizowanie reakcji dupleks RT-PCR do jednoczesnego wykrywania obu wirusów często stwierdzanych w infekcji mieszanej. Zaprojektowane startery amplifikowały gen kodujący białko płaszcza (CP) obu wirusów odpowiednio wielkości: 977 pz WMV oraz 415 pz ZYMV. Czułość wykrywania reakcji dupleks RT-PCR wyniosła 500 pg/µl całkowitego RNA. Specyficzność wykrywania poszczególnych produktów była sprawdzana za pomocą sekwencjonowania metodą Sangera. Opracowana technika może być wykorzystywana do rutynowego wykrywania obu wirusów w zainfekowanych próbkach.

Słowa kluczowe: dupleks RT-PCR, wykrywanie, wirus mozaiki arbuza, wirus żółtej mozaiki cukinii, koinfekcja

Summary

Watermelon mosaic virus (WMV) and zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) are dangerous pathogens infecting cucurbit crops worldwide. In Poland, both viruses are common, especially in the cultivation of zucchini, causing losses in the quality and quantity of crops. The aim of the study was to develop and optimize the duplex RT-PCR reaction for simultaneous detection of both viruses often occurring in mixed infection. The designed primers amplified the gene encoding the coat protein (CP) of both viruses with a size of 977 bp for WMV and 415 bp for ZYMV. The duplex RT-PCR detection limit was 500 pg/ μ l of total RNA. The specificity of detection of individual products was checked by Sanger sequencing. The developed assay can be used for routine detection of both viruses in infected samples.

Key words: duplex RT-PCR, detection, watermelon mosaic virus, zucchini yellow mosaic virus, co-infection

Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

^{*}corresponding author: j.minicka@iorpib.poznan.pl

ORCID: ^A0000-0002-7773-9079, ^B0000-0002-8267-023X

Wstęp / Introduction

Warzywa dyniowate, takie jak ogórek, dynia, cukinia, patison, melon i arbuz należą do rodziny dyniowatych (Cucurbitaceae) i są powszechnie uprawiane na całym świecie. Szacuje się, że rośliny z rodziny dyniowatych mogą być porażane przez ponad 70 gatunków wirusów, do których należą między innymi: przenoszony przez mszyce wirus żółtaczki dyniowatych (cucurbit aphid-borne yellows virus, CABYV), wirus mozaiki ogórka (cucumber mosaic virus, CMV), wirus mozaiki arbuza (watermelon mosaic virus, WMV), wirus żółtej mozaiki cukinii (zucchini yellow mosaic virus, ZYMV) i wirus pierścieniowej plamistości papai (papaya ringspot virus, PRSV) (Desbiez i wsp. 2007; Kassem i wsp. 2013; Lecoq i Katis 2014; Harth i wsp. 2018; Zarzyńska i wsp. 2019). Wirus mozaiki arbuza (WMV) i wirus żółtej mozaiki cukinii (ZYMV) są obecnie najczęściej obserwowane w uprawach dyni i cukinii w Polsce (Borodynko i wsp. 2010; Minicka i wsp. 2020). Obydwa wirusy należą do rodziny Potyviridae, rodzaju Potyvirus, a ich genom stanowi pojedyncza nić RNA o dodatniej polarności (ss(+)RNA) z kowalencyjnie związanym białkiem VPg na końcu 5' oraz ogonem poliA na końcu 3'. Długość genomu w przypadku WMV wynosi około 10 030 nt, natomiast w przypadku ZYMV około 9590 nt. Genom wirusa zawiera jedną ramkę odczytu (ang. open reading frame, ORF), a produktem translacji jest poliproteina, z której w wyniku cięcia przez proteazy powstaje dziesięć białek (P1-Pro, HC-Pro, P3, 6K1, Cl, 6K2, Vpg, NIa-Pro, NIb RdRp, CP) oraz dodatkowo jedenaste białko P3N-PIPO w wyniku zmiany ramki odczytu w cistronie P3 (Balint i wsp. 1990; Riechmann i wsp. 1992; Shukla i wsp. 1994; Revers i wsp. 1999; Chung i wsp. 2008; Revers i García 2015). Cząstki wirusów są nitkowate o długości około 750 nm (Lisa i wsp. 1981). Oba wirusy przenoszone są w sposób nietrwały przez mszyce (m.in. Aphis gossypii Glover, Myzus persicae Sulzer), jak również mechanicznie z sokiem porażonych roślin (Gal-On 2007; Lecoq i Desbiez 2008). Obydwa wirusy powodują zróżnicowane objawy chorobowe na roślinach, prowadzące często do dużych strat w jakości i ilości plonów. Wirus mozaiki arbuza po raz pierwszy został wykryty w Izraelu w 1963 roku (Cohen i Nitzany 1963) i od tego czasu silnie rozprzestrzenił się w uprawach roślin dyniowatych m.in. na terenie Europy, Iranu i Stanów Zjednoczonych (Alonso-Prados i wsp. 1997; Sharifi i wsp. 2008; Borodynko i wsp. 2009; Rajbanshi i Ali 2016). W warunkach eksperymentalnych wirus może porażać ponad 170 gatunków roślin z 27 rodzin, w tym pospolicie występujące chwasty, które mogą stanowić jego rezerwuar. Objawy na porażonych roślinach zależą od gatunku i odmiany gospodarza, warunków środowiskowych czy czasu infekcji (Lecoq i Desbiez 2008). Na roślinach dyniowatych występują najczęściej w postaci mozaiki i deformacji liści. Objawy często występują również na owocach obniżając ich wartość handlową. Obecnie na podstawie różnic w sekwencji białka płaszcza wirusa wyróżniamy trzy grupy WMV: G1, G2 i G3 (Desbiez i wsp. 2007). Izolaty należące do grupy G3 wywołują silniejsze objawy na porażonych roślinach (Desbiez i wsp. 2009; Bertin i wsp. 2020).

Wirus żółtej mozaiki cukinii powoduje straty w uprawach roślin dyniowatych na całym świecie. Po raz pierwszy został zidentyfikowany we Włoszech w 1973 roku i od tego czasu silnie rozprzestrzenił się na wszystkich kontynentach, stając się jednym z najważniejszych wirusów upraw dyniowatych (Lisa i wsp. 1981; Desbiez i Lecoq 2003). Na zainfekowanych roślinach powoduje objawy w postaci mozaiki, deformacji liści i redukcji wzrostu oraz deformacji i nierównomiernego wybarwiania się owoców.

Mnogość patogenów oraz obecność licznych wektorów sprzyja występowaniu mieszanych infekcji, które mogą maskować lub modyfikować objawy chorobowe na porażonych roślinach. Z tego względu odpowiednia diagnostyka, oparta na czułych i specyficznych metodach jest kluczowym narzędziem ograniczającym ich dalsze rozprzestrzenianie się w uprawach. W ostatnich latach opracowano kilka protokołów diagnostycznych służących jednoczesnemu wykrywaniu infekcji mieszanych wirusów porażających rośliny dyniowate, w tym WMV i ZYMV za pomocą techniki multipleks RT-PCR (Kwon i wsp. 2014; de Souza Aguiar i wsp. 2019; Rajbanshi i Ali 2019). Jednakże, z uwagi na występowanie różnych wariantów genetycznych wirusów w Polsce, nie było możliwe jednoczesne wykrycie obu wirusów w infekcjach mieszanych stosując startery literaturowe.

Biorąc pod uwagę wzrastającą produkcję upraw dyniowatych w Polsce, częste występowanie infekcji mieszanych oraz duże zróżnicowanie genetyczne populacji obu wirusów, celem pracy było opracowanie skutecznej i szybkiej metody dupleks RT-PCR do jednoczesnego wykrywania WMV i ZYMV w porażonych roślinach.

Materialy i metody / Materials and methods

Do badań przedstawionych w pracy wykorzystano izolaty WMV i ZYMV wybrane z prób zebranych w trakcie monitoringu upraw cukinii prowadzonych w latach 2012–2020 w województwach: wielkopolskim, mazowieckim oraz kujawsko-pomorskim. Rośliny te charakteryzowały się zróżnicowanymi objawami chorobowymi w postaci: silniejszej lub słabszej mozaiki, malformacji liści, czy nekrozy blaszek liściowych. Do przeprowadzenia doświadczenia wykorzystano 10 roślin zainfekowanych WMV (fot. 1A), 10 roślin zainfekowanych ZYMV (fot. 1B) oraz 10 roślin porażonych dwoma wirusami jednocześnie WMV + ZYMV (fot. 1C). Z fragmentów liści szczytowych porażonych roślin izolowano całkowity RNA metodą fenol/chloroform i mierzono stężenie spektrofotometrycznie (NanoDrop 2000, Thermo



Fot. 1. Objawy chorobowe obserwowane na roślinach cukinii zainfekowanej przez: A – WMV, B – ZYMV, C – infekcję mieszaną WMV i ZYMV



Scientific, Waltham, MA, USA). RNA wyizolowane ze zdrowych roślin wykorzystano jako kontrolę. Wszystkie uzyskane RNA rozcieńczano do uzyskania końcowego stężenia 500 ng/µl. W ramach prowadzonych badań zaprojektowano odpowiednie pary starterów amplifikujące gen kodujący białko płaszcza wirusa (CP), umożliwiające jednoczesne wykrywanie WMV i ZYMV w reakcji dRT-PCR (tab. 1). Startery zaprojektowano na podstawie zestawienia sekwencji izolatów WMV i ZYMV dostępnych w Banku Genów, za pomocą programu OligoAnalyzer i zsyntetyzowano przez firmę Genomed S. A. (Polska). Reakcje RT-PCR prowadzono za pomocą zestawu odczynników DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) w końcowej objętości 10 µl mieszaniny na 1 reakcję. W pierwszym etapie, w celu wybrania odpowiedniej temperatury przyłączania starterów przeprowadzono reakcje RT-PCR dla każdej pary starterów oddzielnie w termocyklerze gradientowym T Professional (Biometra)

Tabela 1. Startery użyte do wykrywania WMV i ZYMV w reakcji dupleks RT-PCR

Table 1. Primers used for detection of WMV and ZYMV in duplex RT-PCR reaction

Starter Primer	Sekwencja 5'-3' Sequence 5'-3'	Długość produktu [pz] Product length [bp]
WMVCPF	ACAACCAAGTGAATTGCA	077
WMVCPR	ATAACGACCCGAAATGCTA	9//
ZYMVCPF	CAGATGGGAGTTGTRATG	415
ZYMVCPR	CGTTCAGTRTCTTCGCTA	413

z zaprogramowanym gradientem temperatur od 45 do 60°C. Reakcje prowadzono w objętości 10 µl. Mieszanina reakcyjna zawierała 5 µl DreamTaq Green PCR Master Mix, 3,4 µl wody, 0,2 µl RevertAid Reverse Transcriptase (200 U/µl), po 0,4 µl odpowiedniej pary starterów: WMVCP/R lub ZYMVCPF/R oraz po 1 µl RNA na każdą próbkę. Profil termiczny obejmował: odwrotną transkrypcję w 42°C przez 20 min, wstępną denaturację w 95°C przez 3 min, a następnie amplifikację w 40 cyklach obejmujących: denaturację w 95°C przez 30 s, przyłączanie starterów w 45-60°C przez 30 s i wydłużanie nici w 72°C przez 1 min oraz wydłużanie końcowe w 72°C przez 7 min. Otrzymane produkty amplifikacji były rozdzielane elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym z barwnikiem Midori Green, w świetle UV względem markera wielkości DNA Hyper-Ladder[™] 100 bp (Bioline, Londyn, Wielka Brytania). Następnie przeprowadzono reakcję dupleks RT-PCR z obiema parami starterów jednocześnie, zgodnie z wcześniej opisaną procedurą w temperaturze wybranej jako optymalna na podstawie wcześniej przeprowadzonych doświadczeń. Celem optymalizacji techniki dRT-PCR stosowano następujące stężenia końcowe starterów: 200 nM, 100 nM oraz 50 nM. Otrzymane produkty amplifikacji rozdzielono w 1% żelu agarozowym względem markera wielkości DNA HyperLadder[™] 100 bp.

W celu porównania czułości wykrywania za pomocą standardowej reakcji RT-PCR oraz reakcji dRT-PCR sporządzono dziesiętne rozcieńczenia całkowitego RNA (od 500 ng/µl do 50 fg/µl), które następnie wykorzystano jako matryce do poszczególnych reakcji. Reakcje przeprowadzono według wcześniej opisanej procedury. Otrzymane produkty amplifikacji rozdzielono w 1% żelu agarozowym względem markera wielkości DNA HyperLadder™ 100 bp.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Przeprowadzona reakcja RT-PCR w termocyklerze gradientowym dla każdej pary starterów oddzielnie wykazała, że WMV jest amplifikowany w przedziale od 47 do 59°C, podczas gdy ZYMV w przedziale od 47 do 57°C (fot. 2A, B). Produkty amplifikacji miały wielkość odpowiednio 977 pz dla WMV oraz 415 pz dla ZYMV. W obu przypadkach nie obserwowano żadnych dodatkowych, niespecyficznych produktów reakcji. Za optymalną temperaturę do przeprowadzenia reakcji dupleks RT-PCR uznano temperaturę 53°C. Następnie oceniono skuteczność amplifikacji w reakcji dRT-PCR przy zastosowaniu różnych stężeń obu par starterów stosując próbki zainfekowane WMV i ZYMV jako kontrolę negatywną. Wykazano, że optymalne stężenie końcowe starterów w reakcji dRT-PCR wynosi odpowiednio 100 nM dla WMV i 100 nM dla ZYMV. Opracowana technika umożliwiła równoczesne wykrycie dwóch badanych wirusów w testowanych próbkach (fot. 3). W próbkach pochodzących ze zdrowych roślin cukinii nie obserwowano produktów amplifikacji.

Następnie w celu określenia czułości wykrywania danego wirusa w reakcji RT-PCR oraz dRT-PCR przygotowano rozcieńczenia dziesiętne całkowitego RNA badanych próbek. Wykazano, że w przypadku reakcji RT-PCR z jedną parą starterów progiem wykrywania dla WMV



M – marker wielkości (Nova 100 bp DNA Ladder), 1 – kontrola negatywna, 2–9 – RNA wyizolowane z roślin porażonych WMV (A) oraz ZYMV (B) M – marker (Nova 100 bp DNA Ladder), 1 – negative control, 2–9 – RNA isolated from plants infected with WMV (A) and ZYMV (B), respectively

Fot. 2. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji RT-PCR w gradiencie temperatur od 47–60°C dla WMV (A) oraz ZYMV (B) Photo 2. Electrophoretic separation of RT-PCR reaction products in a temperature gradient from 47–60°C for WMV (A) and ZYMV (B)



M – marker wielkości (Nova 100 bp DNA Ladder), 1 – RNA wyizolowane z roślin porażonych WMV, 2 – RNA wyizolowane z roślin porażonych ZYMV, 3–7 – RNA wyizolowane z roślin porażonych mieszaną infekcją WMV i ZYMV, 8 – RNA wyizolowane ze zdrowej rośliny, 9 – kontrola negatywna M – marker (Nova 100 bp DNA Ladder), 1 – RNA isolated from plants infected with WMV, 2 – RNA isolated from plants infected with ZYMV, 3–7 – RNA isolated from plants infected with mixed infection of WMV and ZYMV, 8 – RNA isolated from healthy plant, 9 – negative control

Fot. 3. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji dRT-PCR Photo 3. Electrophoretic separation of dRT-PCR reaction products jest stężenie 500 fg/µl, podczas gdy dla ZYMV 50 pg/µl. W przypadku zastosowania reakcji dRT-PCR próg wykrywania wynosił 500 pg/µl (fot. 4). Nieco większa czułość RT-PCR w stosunku do dRT-PCR może wynikać m.in. z wyższej koncentracji wirusa w przypadku pojedynczej infekcji.

Obecność infekcji mieszanych różnych patogenów wirusowych jest zjawiskiem powszechnym w naturze, o daleko idących konsekwencjach epidemiologicznych (Waner 1994; DaPalma i wsp. 2010). Może ona wpływać na objawy chorobowe, zdolność do przenoszenia poszczególnych patogenów i akumulację wirusa (Hammond i wsp. 1999; Wintermantel i wsp. 2008). Z tego względu odpowiednia diagnostyka przy użyciu nowoczesnych metod molekularnych, przeprowadzona na wczesnym etapie infekcji, wydaje się być kluczowym narzędziem umożliwiającym ograniczanie ich występowania.

Prowadzony w latach 2012–2020 przez pracowników Kliniki Chorób Roślin monitoring upraw cukinii w Polsce wykazał obecność licznych wirusów, z których WMV



Do przeprowadzenia reakcji wykorzystano rozcieńczenia dziesiętne totalnego RNA wyizolowanego odpowiednio z roślin porażonych WMV (A), ZYMV (B) lub infekcją mieszaną WMV i ZYMV (C). W przypadku WMV uzyskano produkt amplifikacji wielkości 977 pz (A), dla ZYMV uzyskano produkt wielkości 415 pz (B), natomiast w przypadku infekcji mieszanej oba produkty (C).

M – marker wielkości (Nova 100 bp DNA Ladder), 1 – kontrola negatywna, 2–9 – rozcieńczenia dziesiętne badanych próbek od 500 ng/µl od 50 fg/µl The reaction was carried out using m 10-fold dilutions of total RNA isolated from plants infected with WMV (A), ZYMV (B) or mixed infection of WMV and ZYMV (C), respectively. For WMV, an amplification product of 977 bp was obtained (A), for ZYMV a product of 415 bp was obtained (B) whereas both products were obtained in the case of a mixed infection (C).

M - marker (Nova 100 bp DNA Ladder), 1 - negative control, 2-9 - 10-fold dilutions of test samples from 500 ng/µl to 50 fg/µl

Fot. 4.Porównanie czułości reakcji dRT-PCR z konwencjonalną reakcją RT-PCRPhoto 4.Comparison of the sensitivity of the dRT-PCR reaction with conventional RT-PCR reaction

i ZYMV dominowały w populacji. Z tego względu zaprojektowano i zoptymalizowano reakcję dupleks RT-PCR do jednoczesnego wykrywania WMV i ZYMV w próbkach pochodzących z zainfekowanych cukinii. W warunkach naturalnych oba wirusy mogą powodować podobne objawy chorobowe na zainfekowanych roślinach, w postaci mozaiki o zróżnicowanym stopniu nasilenia oraz zniekształcenia liści i owoców (Borodynko i wsp. 2010). Ponadto, obecność infekcji mieszanych może wpływać na symptomy obserwowane na porażonych roślinach, co znacząco może utrudniać ich rozróżnianie w warunkach polowych. Dupleks RT-PCR jest częstą metodą wykorzystywaną do wykrywania różnych wirusów w infekcjach mieszanych w roślinach (Ito i wsp. 2002; Menzel i wsp. 2002). Podobne prace były również prowadzone dla wirusów z rodziny Potyviridae, jednakże głównie dotyczyły amerykańskiej populacji i wykrywały kilka różnych gatunków wirusów jednocześnie (Kwon i wsp. 2014; Rajbanshi i Ali 2019). Jednakże z uwagi na duże zróżnicowanie genetyczne obu wirusów, przejawiające się obecnością licznych mutacji genetycznych i rekombinantów, zastosowanie odpowiednich narzędzi diagnostycznych jest utrudnione. W tej pracy zaprezentowano szybką, specyficzną i efektywną technikę do wykrywania dwóch najbardziej popularnych wirusów w uprawach cukinii w Polsce. Startery użyte w niniejszej pracy zostały zaprojektowane na postawie zachowawczego regionu genomu obu gatunków, tak aby możliwe byłe wykrywanie jak najszerszego spektrum izolatów. Uzyskane rezultaty wykazują, że reakcja dRT-PCR może być wykorzystywana do jednoczesnego wykrywania obu patogenów w badanych próbkach, co znacznie skraca czas i zmniejsza koszt przeprowadzenia badań.

Wnioski / Conclusions

- Opracowany test umożliwił jednoczesne wykrycie WMV i ZYMV w badanych próbkach.
- dRT-PCR może być z powodzeniem wykorzystywany do wykrywania obu wirusów w infekcjach mieszanych i może być stosowany w rutynowej diagnostyce.

Podziękowanie / Acknowledgements

Badania zrealizowane w ramach tematu statutowego WIB01 "Wykorzystanie nowoczesnych metod molekularnych w diagnostyce patogenów roślin" Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w latach 2016–2020.

Literatura / References

Alonso-Prados J.L., Fraile A., García-Arenal F. 1997. Impact of cucumber mosaic virus and watermelon mosaic virus 2 infection on melon production in central Spain. Journal of Plant Pathology 79 (2): 131–134.

- Balint R., Plooy I., Steele C. 1990. The nucleotide sequence of zucchini yellow mosaic potyvirus. Abstract of the VIIIth International Congress of Virology 8: 84–107.
- Bertin S., Manglli A., McLeish M., Tomassoli L. 2020. Genetic variability of watermelon mosaic virus isolates infecting cucurbit crops in Italy. Archives of Virology 165 (4): 937–946. DOI: 10.1007/s00705-020-04584-9
- Borodynko N., Hasiów-Jaroszewska B., Pospieszny H. 2010. Występowanie i identyfikacja wirusów: żóltej mozaiki cukinii (Zucchini yellow mosaic virus) i mozaiki arbuza (Watermelon mosaic virus) na cukinii w Polsce. [The occurrence and identification

of Zucchini yellow mosaic virus and Watermelon mosaic virus on zucchini plants in Poland]. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych 554: 21–26.

- Borodynko N., Hasiów-Jaroszewska B., Rymelska N., Pospieszny H. 2009. *Watermelon mosaic virus* reported for the first time in Poland. Plant Pathology 58 (4): 783. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2009.02108.x
- Chung B.Y.-W., Miller W.A., Atkins J.F., Firth A.F. 2008. An overlapping essential gene in the Potyviridae. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105 (15): 5897–5902. DOI: 10.1073/pnas.0800468105
- Cohen S., Nitzany F.E. 1963. Identity of viruses affecting cucurbits in Israel. Phytopathology 53 (2): 193-196.
- DaPalma T., Doonan B.P., Trager N.M., Kasman L.M. 2010. A systematic approach to virus–virus interactions. Virus Research 149 (1): 1–9. DOI: 10.1016/j.virusres.2010.01.002
- Desbiez C., Costa C., Wipf-Scheibel C., Girard M., Lecoq H. 2007. Serological and molecular variability of watermelon mosaic virus (genus *Potyvirus*). Archives of Virology 152: 775–781. DOI: 10.1007/s00705-006-0899-4
- Desbiez C., Joannon B., Wipf-Scheibel C., Chandeysson C., Lecoq H. 2009. Emergence of new strains of *Watermelon mosaic virus* in South-eastern France: Evidence for limited spread but rapid local population shift. Virus Research 141 (2): 201–208. DOI: 10.1016/j.virusres.2008.08.018
- Desbiez C., Lecoq H. 2003. Zucchini yellow mosaic virus. Plant Pathology 46 (6): 809–829. DOI: 10.1046/j.1365-3059.1997. d01-87.x
- de Souza Aguiar R.W., Martins A.R., Nascimento V.L., Capone A., Costa L.T.M., Campos F.S., Fidelis R.R., dos Santos G.R., de Oliveira Resende R., Nagata T. 2019. Multiplex RT-PCR identification of five viruses associated with the watermelon crops in the Brazilian Cerrado. African Journal of Microbiology Research 13 (3): 60–69. DOI: 10.5897/AJMR2018.8976
- Gal-On A. 2007. Zucchini yellow mosaic virus: insect transmission and pathogenicity the tails of two proteins. Molecular Plant Pathology 8 (2): 139–150. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2007.00381.x
- Hammond J., Lecoq H., Raccah B. 1999. Epidemiological risks from mixed virus infections and transgenic plants expressing viral genes. Advances in Virus Research 54: 189–314. DOI: 10.1016/S0065-3527(08)60368-1
- Harth J.E., Ferrari M.J., Helms A.M., Tooker J.F., Stephenson A.G. 2018. Zucchini yellow mosaic virus infection limits establishment and severity of powdery mildew in wild populations of *Cucurbita pepo*. Frontiers in Plant Sciences 9: 792. DOI: 10.3389/ fpls.2018.01815
- Ito T., Ieki H., Ozaki K. 2002. Simultaneous detection of six citrus viroids and *Apple stem grooving virus* from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods 106 (2): 235–239. DOI: 10.1016/ S0166-0934(02)00147-7
- Kassem M., Juarez M., Gómez P., Mengual C.M., Sempere R.N., Plaza M., Elena S.F., Moreno A., Fereres A., Aranda M.A. 2013. Genetic diversity and potential vectors and reservoirs of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* in southeastern Spain. Phytopathology 103 (11): 1188–1197. DOI: 10.1094/PHYTO-11-12-0280-R
- Kwon J.Y., Hong J.S., Kim M.J., Choi S.H., Min B.E., Song E.G., Kim H.H., Ryu K.H. 2014. Simultaneous multiplex PCR detection of seven cucurbit-infecting viruses. Journal of Virological Methods 206: 133–139. DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.06.009
- Lecoq H., Desbiez C. 2008. Watermelon mosaic virus and zucchini yellow mosaic virus. s. 433–440. W: Encyclopedia of Virology, Third Edition (B.W.J. Mahy, M.H.V. Van Regenmortel, red.). Academic Press. ISBN 978-0-12-374410-4. DOI: 10.1016/ B978-012374410-4.00740-8
- Lecoq H., Katis N. 2014. Control of cucurbit viruses. Advances in Virus Research 90: 255–296. DOI: 10.1016/B978-0-12-801246-8.00005-6
- Lisa V., Boccardo G., D'Agostino G., Dellavalle G., D'Aquilio M. 1981. Characterization of a potyvirus that causes zucchini yellow mosaic. Phytopathology 71 (7): 667–672.
- Menzel W., Jelkmann W., Maiss E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. Journal of Virological Methods 99 (1–2): 81–92. DOI: 10.1016/S0166-0934(01)00381-0
- Minicka J., Zarzyńska-Nowak A., Budzyńska D., Borodynko-Filas N., Hasiów-Jaroszewska B. 2020. High-throughput sequencing facilitates discovery of new plant viruses in Poland. Plants 9 (7): 820. DOI: 10.3390/plants9070820
- Rajbanshi N., Ali A. 2016. First complete genome sequence of a watermelon mosaic virus isolated from watermelon in the United States. Genome Announcements 4 (2): e00299-16. DOI: 10.1128/genomeA.00299-16
- Rajbanshi N., Ali A. 2019. Simultaneous detection of three common potyviruses infecting cucurbits by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction assay. Journal of Virological Methods 273: 113725. DOI: 10.1016/j.jviromet.2019.113725
- Revers F., García J.A. 2015. Molecular biology of potyviruses. Advances in Virus Research 92: 101–199. DOI: 10.1016/ bs.aivir.2014.11.006
- Revers F., Le Gall O., Candresse T., Maule A.J. 1999. New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. Molecular Plant-Microbe Interaction 12 (5): 367–376. DOI: 10.1094/MPMI.1999.12.5.367
- Riechmann J.L., Laín S., García J.A. 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. Journal of General Virology 73 (1): 1–16. DOI: 10.1099/0022-1317-73-1-1
- Sharifi M., Massumi H., Heydarnejad J., Pour A.H., Shaabanian M., Rahimian H. 2008. Analysis of the biological and molecular variability of Watermelon mosaic virus isolates from Iran. Virus Genes 37 (3): 304–313. DOI: 10.1007/s11262-008-0271-8

Shukla D.D., Ward C.W., Brunt A.A. 1994. The Potyviridae. CAB International, Wallingford, UK, 516 ss.

- Waner J.L. 1994. Mixed viral infections: detection and management. Clinical Microbiology Review 7 (2): 143–151. DOI: 10.1128/ CMR.7.2.143
- Wintermantel W.M., Cortez A.A., Anchieta A.G., Gulati-Sakhuja A., Hladky L.L. 2008. Co-infection by two criniviruses alters accumulation of each virus in a host-specific manner and influences efficiency of virus transmission. Phytopathology 98 (12): 1340–1345. DOI: 10.1094/PHYTO-98-12-1340
- Zarzyńska-Nowak A., Hasiów-Jaroszewska B., Budzyńska D., Borodynko-Filas N. 2019. First report of cucurbit aphid-borne yellows virus infecting zucchini plants (*Cucurbita pepo* convar. *giromontiina*) in Poland. Plant Disease 103 (5): 1047. DOI: 10.1094/PDIS-10-18-1831-PDN