PROGRESS IN PLANT PROTECTION
61 (4): 359-364, 2021
eISSN 2084-4883

DOI: 10.14199/ppp-2021-039
Published online: 15.12.2021

Received: 15.10.2021 / Accepted: 02.12.2021

ARTYKUŁ ORYGINALNY

Zastosowanie techniki odwrotnej transkrypcji i kropelkowo-cyfrowego PCR (RT-ddPCR) do detekcji wirusa nekrozy pomidora (*Tomato torrado virus*, ToTV) w mączliku szklarniowym

Application of reverse transcription and droplet digital PCR (RT-ddPCR) for detection of tomato torrado virus (ToTV) in greenhouse whitefly

Marta Budziszewska*

Streszczenie

Metoda kropelkowo-cyfrowego PCR należy do technologii amplifikacji kwasów nukleinowych trzeciej generacji, znajdując coraz częściej zastosowanie w diagnostyce fitopatogenów m.in. bakterii, nicieni, grzybów oraz wirusów. Ze względu na wysoką czułość, precyzję oraz brak konieczności stosowania krzywych standardowych i/lub genów referencyjnych stanowi doskonałą alternatywę dla łańcuchowej reakcji polimerazy PCR w czasie rzeczywistym. Niniejsza praca przedstawia możliwość zastosowania techniki odwrotnej transkrypcji i ddPCR (RT-ddPCR) do detekcji wirusa nekrozy pomidora (ToTV) w mączliku szklarniowym (*Trialeurodes vaporariorum*), który stanowi realne źródło zagrożenia dla upraw pomidora, szczególnie w krajach Europy południowej, gdzie obserwowane jest nasilone występowanie tego wirusa. Przeprowadzona na matrycy cDNA ocena ilości kopii wirusowego RNA w pojedynczym dorosłym osobniku mączlika szklarniowego wykazała, że może on nieść od 220 do nawet 8600 kopii badanego genu wirusa. Ze względu na brak skutecznych środków przeciwwirusowych, nowoczesne i szybkie techniki detekcji wirusów w roślinach, czy ich wektorach, są istotą walki z rozprzestrzenianiem chorób wirusowych. Opracowany protokół RT-ddPCR do detekcji ToTV w mączlikach może stanowić skuteczne narzędzie do monitorowania realnego zagrożenia chorobą pomidorów określaną przez hiszpańskich farmerów mianem „torrao".

Słowa kluczowe: kropelkowo-cyfrowy PCR, ekspresja absolutna, diagnostyka wirusa nekrozy pomidora, mączlik szklarniowy, transmisja wirusa, wektor owadzi

Abstract

The technology of droplet digital PCR is considered to be third-generation technology of nucleic acid amplification recently developed for the diagnostics of phytopathogens, such as bacteria, nematodes, fungi and viruses. Due to its high sensitivity, precision and no need to use standard curves and/or reference genes it is an alternative to a real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR). This paper presents the possibility of using the reverse transcription technique followed by ddPCR (RT-ddPCR) to detect tomato torrado virus, ToTV in the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*), which is a real source of ToTV in tomato cultivation, especially in southern European countries, where it's increased occurrence has been observed. The analysis of cDNA template evaluation of the virus RNA copies in a single adult greenhouse whitefly showed that it could carry from 220 to even 8600 copies of the virus gene. Due to the lack of effective antiviral agents, innovative and rapid viruses diagnostic assays are the essence of the fight against development of viral diseases. Therfore reported here RT-ddPCR protocol for the detection of ToTV in whiteflies may be an effective tool for monitoring the real threat of the tomato disease described by Spanish farmers as "torrao".

Key words: droplet digital PCR, absolute quantification, tomato torrado virus detection, greenhouse whitefly, virus transmission, insect vector

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań
*corresponding author: m.budziszewska@iorpib.poznan.pl
ORCID: 0000-0002-7637-3191

Wstęp / Introduction

Choroby wirusowe są istotnym czynnikiem ograniczającym produkcję wielu roślin uprawnych na całym świecie powodując tym samym znaczne straty ekonomiczne. Na skutek globalizacji, utrzymujący się na wysokim poziomie handel roślin, nasion, sadzonek, warzyw i owoców niesie ze sobą znaczne ryzyko wprowadzania nowych, licznych wirusów na terytoria różnych krajów. Brak skutecznych środków przeciwwirusowych, szybkie tempo replikacji wirusów, a także częstość mutacji w ich genomie oraz zdolność do rekombinacji powodują, że wirusy z łatwością rozszerzają zakres gospodarzy, wykorzystując nowe wektory do ich transmisji i przystosowując się tym samym do nowych warunków środowiska. Najskuteczniejszym sposobem walki z wirusami jest szybka i precyzyjna diagnostyka, która w dużym stopniu ogranicza ryzyko rozwoju chorób na obszarze plantacji roślin.

W ciągu ostatnich kilkunastu lat obserwujemy szybki rozwój badań molekularnych obejmujących innowacyjne techniki detekcji patogenów roślinnych m.in. wirusów, bakterii, nicieni. Większość z nich to modyfikacje łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. polimerase chain reaction – PCR), jak np. PCR w czasie rzeczywistym (ang. real-time PCR) umożliwiający jakościową i ilościową detekcję patogenu, zaliczany do tzw. technik drugiej generacji. Obecnie, dzięki postępowi technologicznemu, coraz częściej w laboratoriach diagnostycznych wdraża się techniki trzeciej generacji, dążące do miniaturyzacji reakcji, jak np. cyfrowy PCR (ang. digital PCR – dPCR) czy kropelkowo-cyfrowy PCR (ang. droplet digital PCR – ddPCR). Technika ddPCR stanowi szybką, bardzo czułą i wysoce zautomatyzowaną metodę kwantyfikacji kwasów nukleinowych. Głównym założeniem jest frakcjonowanie mieszaniny reakcyjnej na dziesiątki tysięcy kropli, do których losowo jest, lub nie jest, dystrybuowana cząsteczka kwasu nukleinowego, która następnie jest niezależnie powielana w kilkudziesięciu tysiącach powtórzeń. Następnie system odczytuje sygnał fluorescencyjny w każdej kropli, zliczając na tej podstawie krople pozytywne (jest sygnał) i negatywne (brak sygnału) z wykorzystaniem modelu statystycznego Poissona. Dodatkową zaletą metody jest to, że nie ma konieczności odnoszenia uzyskanych wyników do krzywych standardowych, czy też genów referencyjnych, co znacznie przyspiesza analizę.

Technika ddPCR/RT-ddPCR znalazła zastosowanie w badaniach klinicznych, w diagnostyce chorób, w badaniach prowadzonych na zwierzętach, jak również w badaniach molekularnych i biotechnologii roślin m.in. do detekcji mutacji, charakterystyki linii transgenicznych, wykrywaniu zanieczyszczeń GMO, a także w ochronie roślin do diagnostyki fitopatogenów m.in. bakterii, wirusów, grzybów.

W niniejszej pracy przedstawiono możliwość wykorzystania techniki kropelkowo-cyfrowego PCR do detekcji wirusa nekrozy pomidora (tomato torrado virus, ToTV) w wektorze owadzim – mączliku szklarniowym (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood, 1856) (Pospieszny i wsp. 2007, 2008; Verbeek i wsp. 2007, 2014) (fot. 1), który jako źródło wirusa stanowi ogromne zagrożenie w plantacjach pomidorów. Wirus ToTV jest groźnym patogenem należącym do rodzaju *Torradovirus* w rodzinie Secoviridae (Verbeek i wsp. 2007). Jego gospodarzami roślinnymi są m.in. rośliny należące do psiankowatych, głównie pomidor, ziemniak, papryka (Pospieszny i wsp. 2007). Wirus został wykryty również w chwastach, które mogą stanowić jego rezerwuar (Alfaro-Fernández i wsp. 2008). Porażone rośliny początkowo wykazują symptomy chorobowe przejawiające się nekrozą u podstawy blaszki liściowej (fot. 1), które wraz z postępem infekcji opanowują całą roślinę (Budziszewska i wsp. 2008). Cechą ToTV jest wysoka ekspansywność, na przełomie ostatnich kilkunastu lat wirus został odnotowany m.in. w Europie, Ameryce oraz Australii wraz z Oceanią (van der Vlugt i wsp. 2015).

Celem przeprowadzonych badań było opracowanie i zoptymalizowanie testu do detekcji ToTV za pomocą reakcji RT-ddPCR oraz określenie bezwzględnej liczby kopii wirusa, jaką może przenosić dorosły owad.

Materiały i metody / Materials and methods

Materiał do badań stanowiła populacja owadów mączlika szklarniowego *T. vaporariorum*, utrzymywana w zamkniętych izolatorach, żerująca na zdrowych roślinach tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.), w szklarni Zakładu Biologii Molekularnej i Biotechnologii Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu. Dorosłe mączliki, w ilości 20–30 osobników, przenoszono ze zdrowych roślin na rośliny pomidora uprzednio mechanicznie inokulowane wirusem Kra-ToTV i wykazujące objawy chorobowe zgodnie z procedurą opisaną przez Pospiesznego i wsp. (2008). Izolację całkowitego RNA z owadów prowadzono z użyciem odczynnika TriReagent (ThermoFisher), a następnie ekstrahowano chloroformem. Całkowity RNA wytrącono przy użyciu 2-propanolu poprzez wirowanie 20 min, 12 000 rpm, w temperaturze 4°C. Osad RNA zawieszano w 10 µl wody. Na każdą próbę składały się dwa osobniki. Stężenie wyizolowanego RNA mierzono z użyciem spektrofotometru NanoDrop (ThermoFisher). Reakcję odwrotnej transkrypcji (RT) prowadzono z użyciem zestawu Revert Aid Kit cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher) z połowy objętości (4,5 µl) całkowitego RNA wyizolowanego z dwóch owadów. Reakcję ddPCR prowadzono zgodnie z zaleceniami producenta wykorzystując system Biorad QX200. Reakcję prowadzono w 20 µl mieszaniny zawierającej 1X QX200 ddPCR EvaGreen Supermix (Biorad), 0,1 µM mieszaninę starterów qToTV2F 5'GATTTGTCCCAAGACAGGTG3' i qToTV2R 5'AAAGTTTCCTGGTGGTTTCC3' komple-

mentarnych w obrębie regionu kodującego białko Orf1 na nici RNA2. Do każdej reakcji dodano 1 µl cDNA. Próby bardzo dokładnie wymieszano, a następnie całość o objętości 20 µl umieszczono na komercyjnej płytce ze studzienkami połączonymi mikrokanalikami tzw. cartrige zgodnie z instrukcją producenta. Następnie do odpowiednich studzienek dodano 70 µl oleju QX200™ Droplet Generation Oil for EvaGreen (Bio-Rad) i wykorzystując QX200 Droplet Generator (Bio-Rad) przygotowano emulsję. Przygotowaną mieszaninę emulsyjną przepipetowano na 96-dołkową płytkę i umieszczono w termocyklerze C1000Touch Thermal Cycler (Bio-Rad), przeprowadzając reakcję PCR. Profil termiczny reakcji, zgodnie z rekomendacją producenta, etap przyłączania specyficznych starterów oraz elongacji prowadzono w temperaturze 60°C przez 1 min. Po zakończonej reakcji PCR płytkę umieszczono w QX200 Droplet Reader (Bio-Rad) i stosując oprogramowanie QuantaSoft sczytano sygnał fluorescencji oraz korzystając z formuły Poissona obliczono absolutną liczbę kopii genu wirusa ToTV w badanych próbach owadzich. Czułość metody sprawdzono stosując 10-krotne rozcieńczenia plazmidu zawierającego kopię cDNA RNA2 ToTV o stężeniu wyjściowym 120 ng/µl. Dodatkowo tych samych matryc cDNA użyto do reakcji PCR stosując komercyjny zestaw DreamTaq. Reakcje prowadzono w objętości 20 µl, ze starterami qToTV2F/R o stężeniu 0,5 µM i temperaturze przyłączania 60°C. Produkty RT-PCR analizowano w 1% żelu agarowym.

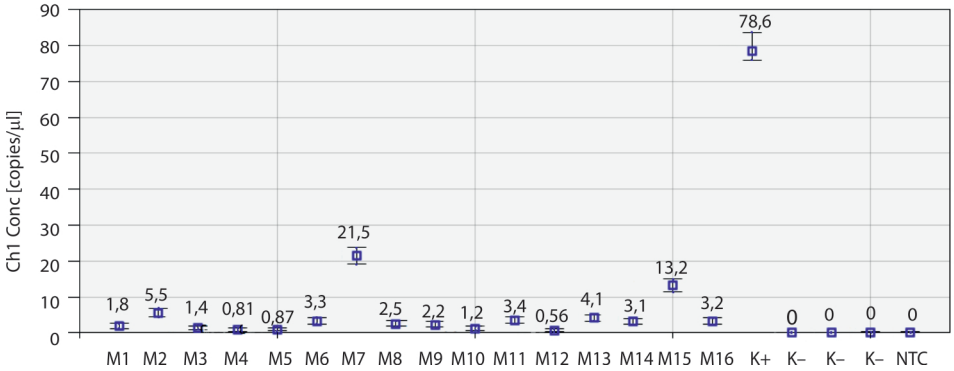
Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Badanie możliwości przenoszenia patogenów przez wektory jest jednym z ważnych aspektów charakterystyki chorób wirusowych. Wyniki przeprowadzonych analiz potwierdzają przydatność metody RT-ddPCR do szybkiego wykrywania obecności genów wirusa ToTV w mączliku szklarniowym. Opracowany protokół obejmujący reakcję odwrotnej transkrypcji, a następnie ddPCR na matrycy całkowitego RNA wyizolowanego z pojedynczych mączlików (fot. 1) pozwolił określić absolutną liczbę kopii badanego genu wirusa ToTV (Orf1) w 1 µl mieszaniny reakcyjnej (rys. 1). Z kolei obliczona przez program Quantasoft (Bio-Rad) liczba kopii genu/20 µl mieszaniny reakcyjnej w przeliczeniu na ilość uzyskanego cDNA z pojedynczego owada pozwoliła określić absolutną liczbę kopii badanego genu wirusa, jaką niesie ze sobą jeden dorosły osobnik. Analizując zebrane dane, absolutna ilość kopii wirusa na podstawie genu Orf1, na nici RNA2, pokazała że jeden osobnik dorosły może przenosić od 220 do nawet 8600 kopii (tab. 1). Dodatkowo przeprowadzony test czułości pokazał, że metodą ddPCR można wykryć badany gen wirusa przy rozcieńczeniu matrycy 120 ng/µl × 10^{-8}, podczas gdy w konwencjonalnym RT-PCR czułość jest 100-krotnie mniejsza (rys. 2). Produkt reakcji PCR na matrycy plazmidowego DNA o stężeniu 120 ng/µl × 10^{-1}–10^{-6} był widoczny w żelu agarozownym, natomiast przy wyższych rozcieńczeniach matrycy, rzędu 10^{-7}–10^{-10}, nie obserwowano spodziewanego produktu (rys. 2).

Na podstawie artykułów naukowych z ostatnich kilku lat technikę RT-ddPCR wdrożono do detekcji m.in. wirusa ziemianka S (potato virus S, PVS) (Zhang i wsp. 2017), wirusa ziemniaka Y (potato virus Y, PVY) (Mehle i wsp. 2018), wirusa miotlastości wierzchołkowej ziemniaka (potato mop-top virus, PMTV) w próbkach ziemi, gdzie źródłem wirusa jest wektor – pierwotniak *Spongospora subterranea* (Pandey i wsp. 2020). Ghoshal i wsp. (2015) określili liczbę kopii genów białka płaszcza oraz *p33* ORF dla wirusa tomato bushy stunt virus oraz cucumber necrosis virus. DeBlasio i wsp. (2018) wykorzystali ddPCR do diagnostyki wirusa liściozwoju ziemniaka (potato leaf roll virus, PLRV) i wirusa kędzierzawki tytoniu (tobacco rattle virus, TRV). Z kolei Budziszewska i wsp. (2021) opublikowali wyniki potwierdzające przydatność techniki RT-ddPCR do detekcji wirusa karłowatości orzecha ziemnego (peanut stunt virus, PSV) w pojedynczych larwach, poczwarkach oraz osobnikach dorosłych ziemiórki *Bradysia impatiens*, eksponowanych uprzednio na wirusa oraz w roślinach, na których

Fot. 1. Objawy chorobowe na pomidorze powodowane wirusem nekrozy pomidora, ToTV (po lewej). Mączlik szklarniowy *Trialeurodes vaporariorum* żerujący na roślinie pomidora (po prawej)

Photo 1. Disease symptoms on tomato plants caused by tomato necrosis virus, ToTV (on the left). The greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* feeding on a tomato plant (on the right)



Rys. 1. Detekcja wirusa ToTV w owadach *Trialeurodes vaporariorum* techniką RT-ddPCR na podstawie genu kodującego Orf1 na nici RNA2
Diagram przedstawia liczbę kopii genu wirusowego w 1 µl mieszaniny reakcyjnej, zawierającej 1 µl cDNA z pojedynczego owada (M1–M16) żerującego na roślinie pomidora porażonego wirusem ToTV. Jako kontroli negatywnej użyto cDNA z owada żerującego na zdrowej roślinie (K-). W kontroli pozytywnej (K+) jako matrycy do reakcji użyto 1 µl plazmidu z cDNA dla RNA2 ToTV (koncentracja 120 ng/µl × 10^{-6})

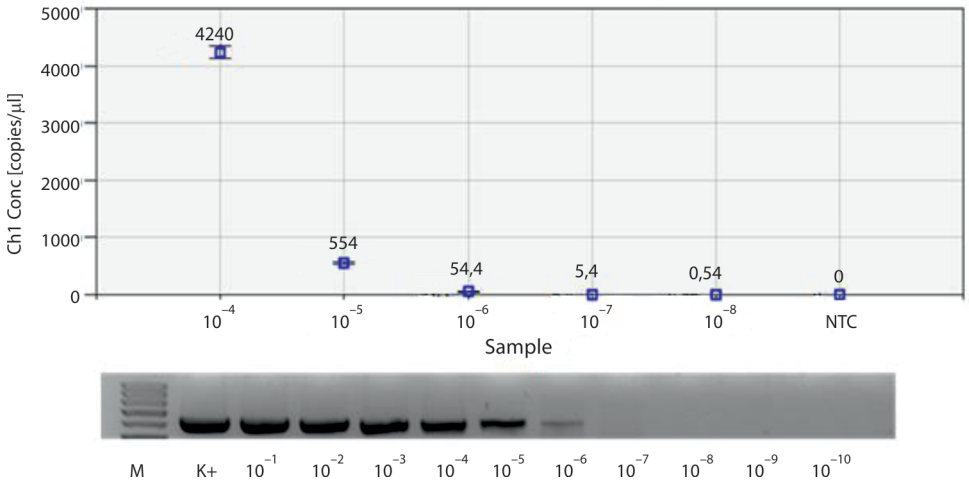
Fig. 1. The detection of ToTV in *Trialeurodes vaporariorum* using RT-ddPCR assay based on the gene encoding Orf1 of RNA2
Diagram showed the number of viral copies in 1 µl of reaction mixture, containing 1 µl of cDNA from single insect (M1–M16) feeding on ToTV – infected tomato. As negative control 1 µl of cDNA from non-ToTV exposed was used (K-), whereas in positive control (K+) 1 µl of plasmid carrying cDNA of ToTV RNA2 was used (concentration 120 ng/µl × 10^{-6})

Tabela 1. Ewaluacja ilości kopii wirusa ToTV na podstawie genu Orf1 w pojedynczych osobnikach mączlika, obliczona na podstawie stosunku kropel pozytywnych i negatywnych z zastosowaniem formuły Poissona, z użyciem programu QuantaSoft (Bio-Rad)

Table 1. Evaluation of copy number of ToTV Orf1 gene in single adult of whitefly, on the basis of ratio of the number of positive and negative droplets using the Poisson statistical formula, using QuantaSoft software (Bio-Rad)

Próba Sample	Liczba kopii wirusa/1 µl mieszaniny reakcyjnej Viral copy number/1 µl reaction mixture	Liczba kopii wirusa/20 µl mieszaniny reakcyjnej Viral copy number/20 µl reaction mixture	Liczba kopii wirusa/owad Viral copy number/insect
M1	1,8	36	720
M2	2,2	44	880
M3	5,5	110	2200
M4	1,2	24	480
M5	1,4	28	560
M6	3,4	68	1360
M7	0,81	16,2	324
M8	0,56	11,2	224
M9	0,87	17,4	348
M10	4,1	82	1640
M11	3,3	66	1320
M12	3,1	62	1240
M13	21,5	430	8600
M14	13,2	264	5280
M15	2,5	50	1000
M16	3,2	64	1280

w kolejnym etapie żerowały zanieczyszczone wirusem larwy. Na podstawie uzyskanych wyników po raz pierwszy zidentyfikowano tego szkodnika jako wektor wirusa. Natomiast Pinheiro i wsp. (2017) wykorzystali technikę do określenia infekcyjności mszyc *Myzus persicae* wirusem PLRV po 24 i 72 h żerowania na chorych roślinach.



Rys. 2. Porównanie czułości ddPCR (u góry) i konwencjonalnego PCR na podstawie fragmentu regionu Orf1 nici RNA2 ToTV (poniżej) z użyciem szeregu 10-krotnych rozcieńczeń plazmidu
Diagram przedstawiający liczbę kopii wirusa w 1 µl mieszaniny reakcyjnej ddPCR nie uwzględnia zakresu stężeń od 10^{-1}–10^{-3}, ponieważ zbyt małe rozcieńczenie powodowało saturację systemu

Fig. 2. The comparison of detection limit of ddPCR (above) and conventional PCR with primers complementary to Orf1 gene of ToTV RNA2 (under) using 10-fold serial dilutions of plasmid with target copies
Diagram showed the absolute viral copy number in 1 µl of ddPCR reaction mixture, the dilution range from 10^{-1}–10^{-3} was not included to avoid saturation of ddPCR reaction

Dotychczasowe protokoły diagnostyczne do wykrywania wirusa ToTV wykorzystywały takie techniki, jak DAS-ELISA (Pospieszny i wsp. 2010), RT-PCR (Alfaro-Fernández i wsp. 2010; Verbeek i wsp. 2012; Wieczorek i Obrępalska-Stęplowska 2013; van der Vlugt i wsp. 2015), RT-qPCR z zastosowaniem specyficznych starterów oraz sond TaqMan (Herrera-Vásquez i wsp. 2015), test HRM (Budziszewska i wsp. 2014), a także testy serologiczno-molekularne, takie jak immunocapture (IC)-RT-PCR oraz IC-RT-qPCR (Pospieszny i wsp. 2007, 2012). W 2016 roku został opracowany również protokół z wykorzystaniem izotermicznej amplifikacji RT-LAMP (Budziszewska i wsp. 2016), która pomimo tego iż jest tania, niezwykle szybka, specyficzna i czuła, często niesie ze sobą duże ryzyko kontaminacji. W związku z niską koncentracją materiału genetycznego wyizolowanego z jednego osobnika mączlika, zastosowanie techniki amplifikacji trzeciej generacji pozwala szybko i precyzyjnie oszacować realne zagrożenie rozprzestrzeniania choroby powodowanej ToTV. Co więcej, niniejsza praca stanowi pierwsze doniesienie o wykorzystaniu innowacyjnej techniki RT-ddPCR do monitoringu wirusa ToTV w populacji mączlika szklarniowego.

Wnioski / Conclusions

1. Wykazano przydatność techniki RT-ddPCR do bezwzględnej oceny akumulacji wirusa ToTV w mączliku szklarniowym.
2. Przeliczając uzyskane wartości koncentracji wirusa w mieszaninie reakcyjnej ddPCR wykazano, że pojedynczy owad może nieść od około 220 do nawet 8600 kopii wirusa ToTV.
3. Test diagnostyczny w oparciu o RT-ddPCR może być wykorzystywany jako bardzo czuła technika wykrywania realnego zagrożenia wirusem ToTV, poprzez określenie infekcyjności odłowionych osobników mączlika szklarniowego.
4. Metoda może być przydatna pod kątem wykrywalności również innych wirusów roślin uprawnych, a także w badaniach prób środowiskowych. W przypadku roślin szczególnie istotna może być detekcja wirusa tuż po zakażeniu, gdy jego miano jest na bardzo niskim poziomie, albo w sytuacji, gdy na plantacji pojawia się potencjalny wektor biorący udział w jego transmisji.

Podziękowanie / Acknowledgements

Autorka pragnie podziękować dr hab. Aleksandrze Obrępalskiej-Stęplowskiej za cenne uwagi merytoryczne podczas przygotowywania manuskryptu.

Finansowanie / Funding

Badania sfinansowane z Narodowego Centrum Nauki, projekt nr 2016/21/D/NZ9/02468.

Literatura / References

Alfaro-Fernández A., Córdoba-Sellés C., Cebrián M.C., Herrera-Vásquez J.A., Sánchez-Navarro J.A., Juárez M., Jordá C. 2008. First report of Tomato torrado virus on weed hosts in Spain. Plant Disease 92 (5): 831. DOI: 10.1094/PDIS-92-5-0831B

Alfaro-Fernández A., Córdoba-Sellés M.D.C., Juárez M., Herrera-Vásquez J., Sánchez-Navarro J., Cebrián M.D.C., Jordá C. 2010. Occurrence and geographical distribution of the 'Torrado' disease in Spain. Journal of Phytopathology 158 (7–8): 457–469. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2009.01639.x

Budziszewska M., Frąckowiak P., Obrępalska-Stęplowska A. 2021. Analysis of the role of *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae) as a vector transmitting peanut stunt virus on the model plant *Nicotiana benthamiana*. Cells 10 (6): 1546. DOI: 10.3390/cells10061546

Budziszewska M., Obrępalska-Stęplowska A., Wieczorek P., Pospieszny H. 2008. The nucleotide sequence of a Polish isolate of Tomato torrado virus. Virus Genes 37 (3): 400–406. DOI: 10.1007/s11262-008-0284-3

Budziszewska M., Wieczorek P., Obrępalska-Stęplowska A. 2016. One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for detection of tomato torrado virus. Archives of Virology 161: 1359–1364. DOI: 10.1007/s00705-016-2774-2

Budziszewska M., Wieczorek P., Zhang Y., Frishman D., Obrępalska-Stęplowska A. 2014. Genetic variability within the polish tomato torrado virus Kra isolate caused by deletions in the 3′-untranslated region of genomic RNA1. Virus Research 185: 47–52. DOI: 10.1016/j.virusres.2014.03.008

DeBlasio S.L., Rebelo A.R., Parks K., Gray S., Cilia M. 2018. Disruption of chloroplast function through downregulation of phytoene desaturase enhances the systemic accumulation of an aphid-borne, phloem-restricted virus. Molecular Plant-Microbe Interactions 31 (10): 1095–1110. DOI: 10.1094/MPMI-03-18-0057-R

Ghoshal K., Theilmann J., Reade R., Maghodia A., Rochon D.A. 2015. Encapsidation of host RNAs by cucumber necrosis virus coat protein both during agroinfiltration and infection. Journal of Virology 89 (21): 10748–10761. DOI: 10.1128/JVI.01466-15

Herrera-Vásquez J.A., Rubio L., Alfaro-Fernández A., Debreczeni D.E., Font-San-Ambrosio I., Falk B.W., Ferriol I. 2015. Detection and absolute quantitation of Tomato torrado virus (ToTV) by real time RT-PCR. Journal of Virological Methods 221: 90–94. DOI: 10.1016/j.jviromet.2015.04.029

Mehle N., Dobnik D., Ravnikar M., Novak M.P. 2018. Validated reverse transcription droplet digital PCR serves as a higher order method for absolute quantification of Potato virus Y strains. Analytical and Bioanalytical Chemistry 410 (16): 3815–3825. DOI: 10.1007/s00216-018-1053-3

Pandey B., Mallik I., Gudmestad N.C. 2020. Development and application of a real-time reverse-transcription PCR and droplet digital PCR assays for the direct detection of Potato mop top virus in soil. Phytopathology 110 (1): 58–67. DOI: 10.1094/PHYTO-05-19-0185-FI

Pinheiro P.V., Ghanim M., Alexander M., Rebelo A.R., Santos R.S., Orsburn B.C., Gray S., Cilia M. 2017. Host plants indirectly influence plant virus transmission by altering gut cysteine protease activity of aphid vectors. Molecular & Cellular Proteomics 16 (4): S230–S243. DOI: 10.1074/mcp.M116.063495

Pospieszny H., Borodynko N., Obrępalska-Stęplowska A., Hasiów B. 2007. The first report of Tomato torrado virus in Poland. Plant Disease 91 (10): 1364. DOI: 10.1094/PDIS-91-10-1364A

Pospieszny H., Budziszewska M., Hasiów B., Obrępalska-Stęplowska A., Borodynko N. 2008. Wirus nekrozy pomidora (Tomato torrado virus) nowy wirus przenoszony przez mączlika szklarniowego (*Trialeurodes vaporariorum*). [Tomato torrado virus a new virus transmitted by greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) in Poland]. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych 529: 139–147.

Pospieszny H., Budziszewska M., Hasiów-Jaroszewska B., Obrępalska-Stęplowska A., Borodynko N. 2010. Biological and molecular characterization of Polish isolates of Tomato torrado virus. Journal of Phytopathology 158 (1): 56–62. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2009.01563.x

Pospieszny H., Hasiów-Jaroszewska B., Rymelska N., Borodynko N. 2012. Zastosowanie techniki IC real-time RT-PCR do wykrywania wirusa nekrozy pomidora (ToTV) w siewkach z porażonych nasion. [Using the IC real-time RT-PCR technique for the detection of tomato torrado virus (ToTV) in tomato seedling from infected seeds]. Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin 52 (3): 515–517. DOI: 10.14199/ppp-2012-090

van der Vlugt R.A., Verbeek M., Dullemans A.M., Wintermantel W.M., Cuellar W.J., Fox A., Thompson J.R. 2015. Torradoviruses. Annual Review of Phytopathology 53: 485–512. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080614-120021

Verbeek M., Dullemans A.M., Van den Heuvel J.F.J.M., Maris P.C., Van der Vlugt R.A.A. 2007. Identification and characterisation of tomato torrado virus, a new plant picorna-like virus from tomato. Archives of Virology 152 (5): 881. DOI: 10.1007/s00705-006-0917-6

Verbeek M., Tang J., Ward L.I. 2012. Two generic PCR primer sets for the detection of members of the genus Torradovirus. Journal of Virological Methods 185 (2): 184–188. DOI: 10.1016/j.jviromet.2012.06.020

Verbeek M., van Bekkum P.J., Dullemans A.M., van der Vlugt R.A. 2014. Torradoviruses are transmitted in a semi-persistent and stylet-borne manner by three whitefly vectors. Virus Research 186: 55–60. DOI: 10.1016/j.virusres.2013.12.003

Wieczorek P., Obrępalska-Stęplowska A. 2013. Multiplex RT-PCR reaction for simultaneous detection of Tomato torrado virus and Pepino mosaic virus co-infecting *Solanum lycopersicum*. Journal of Plant Protection Research 53 (3): 289–294. DOI: 10.2478/jppr-2013-0043

Zhang Y., Huang J., Wang X., Zhou H., Li X., Fu W., Zhu P., Wang C. 2017. Detection of Potato virus S (PVS) by droplet digital PCR (ddPCR). Journal of Agricultural Biotechnology 25 (10): 1721–1728. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7968.2017.10.019