

АГРОНОМИЯ

4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология

Научная статья
УДК 632.3:578.2
doi: 10.28983/asj.y2024i12pp73-77

Молекулярная диагностика обнаружения вириода веретенковидности клубней картофеля (PSTVd) с помощью ПЦР-РВ

Андрей Робертович Пухаев, Нино Нодаровна Догузова

Владикавказский научный центр Российской академии наук, г. Владикавказ, Россия
e-mail: doguzovanino@yandex.ru

Аннотация. Вириод веретенковидности клубней картофеля (ВВКК) – патоген, который может нанести большой экономический ущерб сельскому хозяйству. Картофель, зараженный ВВКК, отстает в росте, со временем растения становятся карликовыми. У растений картофеля уменьшается количество стеблей, листья отходят от стебля под прямым углом (симптомы «готики»). Листья становятся более мелкими, наблюдается их серповидность и плещелистность. Клубни зараженных растений картофеля значительно уменьшаются в размере, происходит их деформация. Они приобретают удлинённую веретенковидную или грушевидную (гантелевидную) форму. Количество самих клубней уменьшается. При хранении больные клубни часто поражаются разными видами гнилей. Визуальная идентификация больных растений и клубней возможна лишь при поражении суровым штаммом и на более поздних стадиях развития болезни. Не все клубни зараженных растений проявляют все или даже любой из перечисленных симптомов, заболевание может протекать и бессимптомно. Поэтому очень важно выявить заболевание на ранней стадии. Выявление этого патогена проводят в лабораторных условиях методом ПЦР. В настоящее время из-за отсутствия эффективных методов оздоровления картофеля от PSTVd большое значение имеют методы ПЦР диагностики вириода для предотвращения его дальнейшего распространения. Впервые на территории Республики РСО-Алания проведена молекулярная диагностика PSTVd – возбудителя болезни картофеля. Для предотвращения потерь урожая большое значение имеет обнаружение его на ранних стадиях заражения.

Ключевые слова: картофель; карантин; гибрид; вириод веретенковидности клубней картофеля PSTVd; ДНК; ПЦР-РВ

Для цитирования: Пухаев А. Р., Догузова Н. Н. Молекулярная диагностика для обнаружения вириода веретенковидного клубня картофеля (PSTVd) с помощью ПЦР-РВ // Аграрный научный журнал. 2024. № 12. С. 73–77. <http://dx.doi.org/10.28983/asj.y2024i12pp73-77>.

AGRONOMY

Original article

Molecular diagnostics for detection of potato spindle tuber viroid (PSTVd) using RT-PCR

Andrey R. Pukhaev, Nino N. Doguzova

Vladikavkaz Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, Russia
e-mail: doguzovanino@yandex.ru

Abstract. Potato spindle tuber viroid (PSTVd) is a pathogen that can cause great economic damage to agriculture. Potatoes infected with PSTVd are stunted in growth, and over time the plants become dwarf. In potato plants, the number of stems decreases, the leaves extend from the stem at right angles (symptoms of “Gothic”). The leaves become smaller and become sickle-shaped and ivy-leafed. Tubers of infected potato plants are significantly reduced in size and deformed. They acquire an elongated fusiform or pear-shaped (dumbbell-shaped) shape. The number of tubers themselves decreases. During storage, diseased tubers are often affected by various types of rot. Visual identification of diseased plants and tubers is possible only when affected by a severe strain and at later stages of disease development. Not all tubers of infected plants exhibit all or even any of the listed symptoms; the disease may be asymptomatic. Therefore, it is very important to identify the disease at an





early stage. Detection of this pathogen is carried out in laboratory conditions using the PCR method. Currently, due to the lack of effective methods for treating potatoes from PSTV, PCR methods for diagnosing the viroid are of great importance to prevent its further spread. For the first time in the Republic of North Ossetia-Alania, molecular diagnostics of PSTVd, the causative agent of potato disease, was carried out. Detection at the early stages of infestation is of great importance to prevent crop losses.

Keywords: potato; quarantine; hybrid; spindle viroid of potato tubers PSTVd; DNA; RT-PCR

For citation: Pukhaev A. R., Doguzova N. N. Molecular diagnostics for detection of potato spindle tuber viroid (PSTVd) using RT-PCR. *Agrarnyy nauchnyy zhurnal = Agrarian Scientific Journal*. 2024;(12):73–77. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.28983/asj.y2024i12pp73-77>.

Введение. Картофель является одной из наиболее значимых продовольственных культур для человека. Мировой рынок производства этой культуры превышает 388 млн т в год, а потребление на душу населения в России превышает 110 кг. Поэтому исследования, связанные с оптимизацией производства картофеля, повышением урожайности и сокращением потерь, связанных с болезнями растений и другими факторами, необходимы и актуальны. Наиболее важным направлением является изучение восприимчивости растений картофеля к большому количеству возбудителей болезней [2, 4, 5]. Возбудители болезней включают в себя грибы, бактерии, нематоды, микоплазмы, вирусы и вириды. Вириод веретеновидности клубня картофеля (PSTVd), несмотря на название, поражает не только картофель, вызывая потери урожая до 80 %, но и другие растения из семейства Пасленовые, в том числе томат и перец [1, 3, 6].

Вириод веретеновидности клубня картофеля – самый маленький из известных инфекционных агентов болезней растений. Представляет собой кольцевую одноцепочечную молекулу РНК длиной 359 нуклеотидов с характерной складчатостью, которая вызывает заболевание веретеновидного клубня картофеля [7, 8, 12,13].

Патоген обладает способностью проникать в любую часть картофельного куста: в стебли и листья – при контакте с ботвой зараженного растения, в клубни – из почвы. Вириод веретеновидности клубня картофеля чрезвычайно контагиозный патоген, который может передаваться разными способами. Его переносят насекомые: луговые клопы, кузнечики, колорадские жуки. Источником заражения часто становится сельскохозяйственный инвентарь, которым обрабатывали больные кусты. Высока вероятность инфицирования семенных клубней, если при посадке не дезинфицируют нож после разрезания картофелин. ВВКК может передаваться семенами и пылью, что особенно опасно при проведении селекционно-генетических работ и получении трансгенных растений. Передача ВВКК тлей и листогрызущими насекомыми теоретически возможна, но доказана только в случае передачи персиковой тлей при наличии смешанной инфекции с вирусом скручивания листьев картофеля.

Растения картофеля, зараженные ВВКК, отстают в росте, после нескольких лет выращивания становятся карликовыми. Имеют прямостоячий габитус, уменьшается количество стеблей, листья отходят от стебля под прямым углом (симптомы «готики»). Как правило, листья становятся более мелкими, иногда имеют красноватую окраску, наблюдается их серповидность и плющелистность. Больные растения раньше отмирают. Клубни у большинства сортов после 1–3 лет заражения ВВКК имеют удлиненную веретеновидную или грушевидную форму с выступающими глазками и резко выраженными «бровями». Иногда на клубнях появляются продольные трещины. При хранении больные клубни больше поражаются разными видами гнилей [9, 10, 15].

Из-за своего широкого распространения и способности вызывать серьезные заболевания вириды относятся к основным факторам, ограничивающим продуктивность сельскохозяйственных культур. Единственным средством борьбы с виридными заболеваниями являются чувствительные диагностические процедуры с последующим уничтожением зараженного материала [11,14].

Цель исследования – выявить с помощью полимеразной цепной реакции в реальном ПЦР-РВ вириод веретеновидности клубней картофеля, провести диагностику сортообразцов на наличие (PSTVd).

Материалы и методы. Исследования выполняли на базе лаборатории молекулярно-генетических исследований Владикавказского научного центра с использованием приборно-аппаратной линии для проведения ПЦР-анализа.

Изучали свежие листья картофеля (*Solanum tuberosum* L.), собранные до цветения. ДНК и РНК из образцов выделяли с помощью набора «ФитоСорб П» на магнитных частицах. РНК элюиро-

вали в 100 мкл буфера для растворения. Использовали наборы реагентов производства ВНИИСБ и ООО «Синтол» для проведения одностадийной реакции обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) на приборе АНК-48 (Институт аналитического приборостроения РАН). Набор реактивов состоял из реакционной смеси, положительного контрольного образца (ПКО), содержащего фрагменты ДНК, ДНК-полимеразы и обратной транскриптазы (syntaq+RT), а также отрицательного контрольного образца (ОКО).

Интерпретацию результатов ПЦР-РВ проводили в соответствии с инструкцией производителя (ООО «Синтол»). Каждую пробу анализировали индивидуально.

Результаты исследований. PSTVd является карантинным во многих странах мира. В перечень карантинных объектов, ограниченно распространенных на территории Российской Федерации, PSTVd был включен в 2015 г. Однако, несмотря на все предпринимаемые меры, данный фитопатоген широко распространился в странах Азии, Африки, Европы, в том числе и в России. Этому способствует и то, что картофель – вегетативно размножаемая культура, в клубнях которой могут выживать не только вирусы, но и вириды.

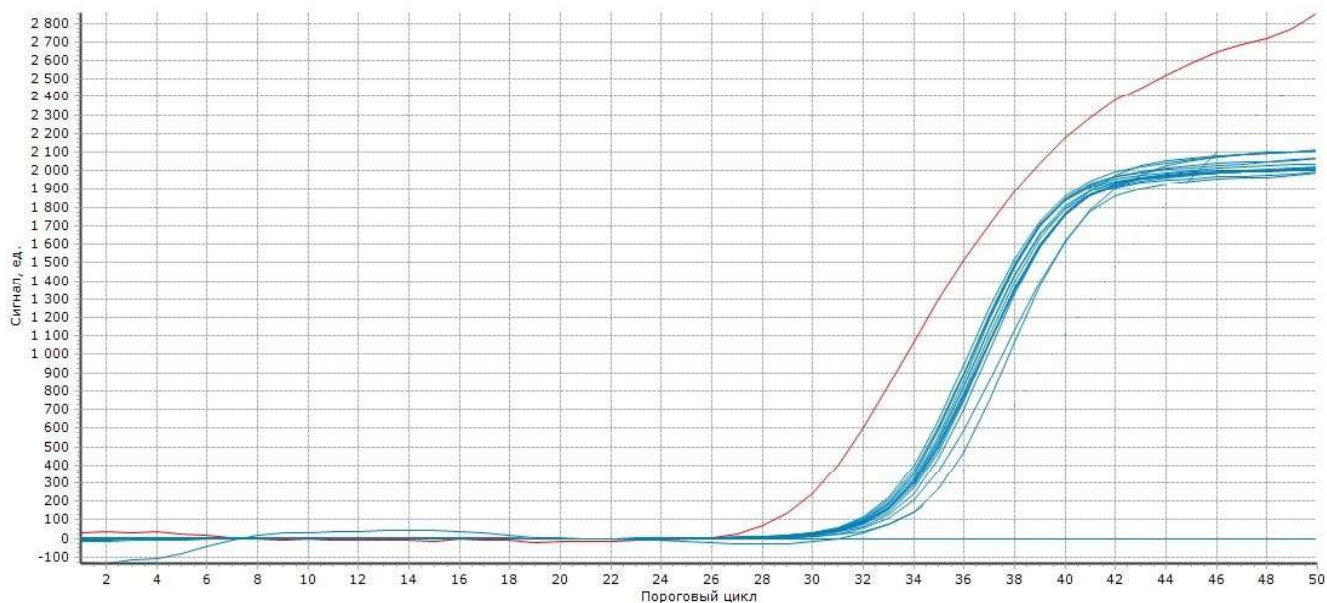
Зараженность образцов определяли с использованием набора реагента Potato spindle tuber viroid-РВ. При исследовании методом ПЦР-РВ в наборе использовали два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих специфический фрагмент гена фитопатогена, и два олигонуклеотидных праймера, фланкирующих ДНК внутреннего положительного контроля, а также два флуоресцентных зонда. В таблице приведены значения порогового цикла, полученные методом ПЦР-РВ. Следует считать, что чем меньше цикл, тем больше вирусной РНК в образце. По каналу флуоресценции FAM определяли наличие в пробе РНК, отрицательный контрольный образец имел отрицательный результат. По каналам R6G осуществляли внутренний положительный контроль (ВПК). Данные анализа показали, что все гибриды картофеля свободны от вирида веретеновидности клубней картофеля. Результаты диагностического исследования образцов картофеля на наличие нуклеиновых кислот к вириду веретеновидности методом полимеразной цепной реакции в реальном времени представлены в таблице и на рисунке.

Результаты выявления вирида *Potato spindle tuber viroid* (2023 г.)

Results of detection of *Potato spindle tuber viroid* (2023)

Номер пробы	Наименование образца	Пороговый цикл (Ct)	
		PSTV (FAM)	R6G (ВПК)
1	ПКО	29,47	31,75
2	ОКО	–	32,88
3	2869/1	–	31,56
4	2869/2	–	32,49
5	21 КИ-2-ФАТ	–	33,07
6	2968/1	–	32,68
7	2975/1	–	32,75
8	2961/1	–	33,26
9	2968/2	–	32,76
10	2361/3	–	31,93
11	2983/1	–	33,12
12	1807ф-3	–	32,62
13	2803/3	–	32,7
14	ОКО-В-1	–	30,45
15	2886-22	–	29,71
16	2361/14	–	32,59
17	2869/3	–	32,44
18	2983/1	–	33,18
19	2975.15	–	31,56
20	2970/17	–	32,55
21	2975.15	–	28,39
22	1961/1	–	33,32
23	2886/14	–	31,71
24	ОКО-В-2	–	32,49





Вироид веретеновидности клубней картофеля (FAM)

Potato spindle tuber viroid (FAM)

Положительный контрольный образец, содержащий фрагмент ДНК *Potato spindle tuber viroid*, вышел на цикле 29,47; отрицательный контрольный образец (ОКО) и отрицательный контроль выделения (ОКО-В1) не обнаружены (см. таблицу). Таким образом, контаминации в данном прогоне не было, и реакция амплификации прошла чисто. Исходя из полученных данных, виroid веретеновидности клубней картофеля в исследуемых образцах не был обнаружен.

Заключение. ПЦР в реальном времени имеет значительный потенциал для количественной оценки низких уровней заболеваемости с высокой чувствительностью и скоростью, что несколько лет назад было невозможно при патологии растений. Картофель подвержен поражению разнообразными вирусами. Поэтому проблема защиты этой культуры является экономически значимой.

На сегодняшний день ПЦР в реальном времени является одним из основных точных и чувствительных методов, выявляющих скрытые вирусные и бактериальные инфекции. Присутствие виroidа веретеноводности клубней картофеля в исследуемых образцах картофеля методом ПЦР в реальном времени не обнаружено.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Заварихина Е. А., Алпатьева Н. В., Рогозина Е. В. ДНК-маркеры гри-генов в потомстве сложных межвидовых гибридов картофеля // Генетические ресурсы растений для генетических технологий. СПб., 2023. С. 89–90. DOI: 10.30901/978-5-907780-00-2.
2. Идентификация родительских форм для селекции картофеля, устойчивого к болезням и вредителям методом мультиплексного ПЦР-анализа / Е. В. Рогозина [и др.] // Сельскохозяйственная биология. 2019. Т. 54(1). С. 19–30. DOI: 10.15389/agrobiology.2019.1.19.
3. Молекулярные маркеры как инструмент в селекции на устойчивость к Y-вирусу картофеля / В. А. Бирюкова [и др.] // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2022. Т. 6. № 6. С. 777–787. DOI: 10.30766/2072-9081.2022.23.6.777-787.
4. Оценка сортов картофеля по устойчивости к вирусным заболеваниям, повышенным температурам воздуха и недостаточному увлажнению / А. Л. Бакунов [и др.] // Международный журнал гуманитарных и естественных наук. 2019. № 11-1(38). С. 47–53. DOI: 10.24411/2500-1000-2019-11693.
5. Поиск источников устойчивости к *Globodera pallida* и к PVX в коллекции отечественных сортов картофеля с использованием молекулярных маркеров / Н. С. Клименко [и др.] // Биотехнология и селекция растений. 2019. Т. 2(1). С. 42–48.
6. Устойчивость листьев и клубней к *Phytophthora infestans* у клонов картофеля, несущих ген *rb/rpi-blb1* / Н. М. Зотеева [и др.] // V Вавиловская Междунар. конф. СПб., 2022. С. 130–131. DOI: 10.30901/978-5-907145-90-0.
7. Устойчивость к возбудителям фитофтороза и глободероза современного сортимента семенного картофеля и его фитосанитарное состояние в различных агроклиматических зонах европейской части России / А. В. Хютти [и др.] // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2022 № 4. С. 363–375. DOI: 10.18699/VJ20.629.
8. Bettoni J. C., Bonnard R., Volk G. M. Challenges in implementing plant shoot tip cryopreservation technologies // Plant Cell Tissue Organ. Cult. 2021. Vol. 144. P. 21–34. DOI: 10.1007/s11240-020-01846-x.
9. Bradshaw J. E. Improving resistance to diseases and pests: a dynamic situation. In *Potato Breeding: Theory and Practice*. 2021. P. 247–337. DOI: 10.1007/978-3-030-64414-7_5.



10. Cryotherapy by encapsulation-dehydration is effective for in vitro eradication of latent viruses from ‘Marubakaido’ apple rootstock / J. C. Bettoni, M. D. Costa, J. A. Souza, G. M. Volk, O. Nickel, F. N. da Silva // *J. Biotechnol.* 2018. Vol. 269. P. 1–7. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2018.01.014.

11. Ex situ conservation of potato [*Solanum* section Petota (Solanaceae)] genetic resources in genebanks / D. Ellis, A. Salas, O. Chavez, R. Gomez, N. Anglin. In *The Potato Crop*. 2020. P. 109–138.

12. Eradication of viruses in microplants of three cultivated potato species (*Solanum tuberosum* L., *S. phureja* Juz. & bulk., *S. stenotomum* Juz. & Buk.) using combined thermos-chemotherapy method / O. Y. Antonova, O. V. Apalikova, Y. V. Ukhatova, E. A. Krylova, O.Y. Shuvalov, A. R. Shuvalov // *Agric. Biol.* 2017. No. 52. P. 95–104. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.1.95eng.

13. Fungal, oomycete, plasmodiophorid diseases of potato, in *The Potato Crop*. / B. Adolf, J. Andrade-Piedra, F. R. Molina, J. Przetakiewicz, H. Hausladen, P. Kromann. 2020. P. 307–350.

14. Potato virus A isolates from three continents: their biological properties, phylogenetics, and prehistory / S. Fuentes, A. J. Gibbs, I. P. Adams, C. Wilson, M. Botermans, A. Fox. // *Phytopatholog.* 2021. Vol. 111. P. 217–226. DOI: 10.1094/PHYTO-08-20-0354-FI.

15. The potato of the future: opportunities and challenges in sustainable Agri-food systems / A. Devaux, J. P. Goffart, P. Kromann, J. Andrade-Piedra, V. Polar, G. Hareau // *Potato Res.* 2021. Vol. 64. P. 681–720. DOI: 10.1007/s11540-021-09501-4.

REFERENCES

1. Zavarikhina E. A., Alpatieva N. V., Rogozina E. V. DNA markers of rpi genes in the progeny of complex interspecific potato hybrids. *Plant genetic resources for genetic technologies*. Saint Petersburg; 2023. P. 89–90. (In Russ.). DOI: 10.30901/978-5-907780-00-2.

2. Identification of parental forms for the selection of potatoes resistant to diseases and pests by the method multiplex PCR analysis / E. V. Rogozina, E. V. Terentyeva, E. K. Potokina, E. N. Yurkina, A. V. Nikulin, Ya. I. Alekseev. *Agricultural Biology*. 2019;54(1):19–30. (In Russ.). DOI: 10.15389/agrobiology.2019.1.19.

3. Molecular markers as a tool in selection for resistance to potato y-virus / V. A. Biryukova, V. A. Zharova, N. A. Chalaya, I. V. Shmyglya, E. V. Rogozina. *Agrarian Science of the Euro-North-East*. 2022;(6):777–787. (In Russ.). DOI: 10.30766/2072-9081.2022.23.6.777-787.

4. Evaluation of potato varieties for resistance to viral diseases, elevated air temperatures and insufficient moisture / A. L. Bakunov, A. V. Milekhin, S. L. Rubtsov, N. N. Dmitrieva. *International Journal of Humanities and Natural Sciences*. 2019;11-1(38):47–53. (In Russ.). DOI: 10.24411/2500-1000-2019-1169.

5. Search for sources of resistance to *Globodera pallida* and PVX in a collection of domestic potato varieties using molecular markers / N. S. Klimenko, T. A. Gavrilenko, L. I. Kostina, F. T. Mamadbokirova, O. Yu. Antonova. *Biotechnology and Plant Breeding*. 2019;2(1):42–48. (In Russ.).

6. Resistance of leaves and tubers to phytophthora infestans in potato clones carrying the rb/rpi-blb1 gene / N. M. Zoteeva, A. V. Hyutti, O. S. Afanasenko, Z. Z. Evdokimova, T. A. Gavrilenko. V Vavilov International Conf. Saint Petersburg; 2022. P. 130–131. (In Russ.). DOI: 10.30901/978-5-907145-90-0.

7. Resistance to pathogens of late blight and globoderosis of the modern assortment of seed potatoes and its phytosanitary condition in various agroclimatic zones of the European part of Russia / A. V. Hyutti, D. A. Rybakov, T. A. Gavrilenko, O. S. Afanasenko. 2022;(4):363–375. DOI: 10.18699/VJ20.629.

8. Bettoni J. C., Bonnard R., Volk G. M. Challenges in implementing plant shoot tip cryopreservation technologies. *Plant Cell Tissue Organ. Cult.* 2021;144:21–34. (In Russ.). DOI: 10.1007/s11240-020-01846-x.

9. Bradshaw J. E. Improving resistance to diseases and pests: a dynamic situation. In *Potato Breeding: Theory and Practice*. 2021. P. 247–337. DOI: 10.1007/978-3-030-64414-7_5.

10. Cryotherapy by encapsulation-dehydration is effective for in vitro eradication of latent viruses from ‘Marubakaido’ apple rootstock / J. C. Bettoni, M. D. Costa, J. A. Souza, G. M. Volk, O. Nickel, F. N. da Silva. *J. Biotechnol.* 2018;269:1–7. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2018.01.014.

11. Ex situ conservation of potato [*Solanum* section Petota (Solanaceae)] genetic resources in genebanks / D. Ellis, A. Salas, O. Chavez, R. Gomez, N. Anglin. In *The Potato Crop*. 2020. P. 109–138.

12. Eradication of viruses in microplants of three cultivated potato species (*Solanum tuberosum* L., *S. phureja* Juz. & bulk., *S. stenotomum* Juz. & Buk.) using combined thermos-chemotherapy method / O. Y. Antonova, O. V. Apalikova, Y. V. Ukhatova, E. A. Krylova, O.Y. Shuvalov, A. R. Shuvalov. *Agric. Biol.* 2017;(52):95–104. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.1.95eng.

13. Fungal, oomycete, plasmodiophorid diseases of potato, in *The Potato Crop*. / B. Adolf, J. Andrade-Piedra, F. R. Molina, J. Przetakiewicz, H. Hausladen, P. Kromann. 2020. P. 307–350.

14. Potato virus A isolates from three continents: their biological properties, phylogenetics, and prehistory / S. Fuentes, A. J. Gibbs, I. P. Adams, C. Wilson, M. Botermans, A. Fox. *Phytopatholog.* 2021;111:217–226. DOI: 10.1094/PHYTO-08-20-0354-FI.

15. The potato of the future: opportunities and challenges in sustainable Agri-food systems / A. Devaux, J. P. Goffart, P. Kromann, J. Andrade-Piedra, V. Polar, G. Hareau. *Potato Res.* 2021;64:681–720. DOI: 10.1007/s11540-021-09501-4.

Статья поступила в редакцию 22.04.2024; одобрена после рецензирования 24.05.2024; принята к публикации 30.05.2024.
The article was submitted 22.04.2024; approved after reviewing 24.05.2024; accepted for publication 30.05.2024.

