Г.А.Яковлева, кандидат биологических наук

Белорусский НИИ картофелеводства

УДК 635.21:632.168

Вироид веретеновидности клубней картофеля. Тестирование коллекции сортов и диких видов картофеля, депонируемой *in vitro* в БелНИИ картофелеводства

В статье представлен краткий обзор имеющихся в литературе сведений об ВВКК: варианты названия болезни; возбудитель и круг хозяев; симптомы болезни на картофеле; визуальная диагностика поражения ВВКК; условия, благоприятные для развития болезни; пути заражения виroidом; географическое распространение ВВКК и способы освобождения от него; методы идентификации ВВКК. В конце статьи представлены результаты совместного с Международным центром картофеля (CIP, Lima) тестирования коллекции института, депонируемой IN VITRO методом гибридизации нуклеиновых кислот на наличие ВВКК; отмечено, что коллекция исходного материала для селекции и семеноводства не содержит ВВКК.

Название болезни

Болезнь веретеновидности клубней картофеля под названием "potato spindle tuber" (веретеновидный клубень картофеля) впервые была описана в 1922 г. W.H.Martin для штата Нью-Джерси в США. В 1923 г. по симптомам надземной части картофеля была названа F.S. Schultz и D. Folsom. "unmottled curly dwarf" potato — непятнистая курчавая карликовость картофеля [1]. В СССР в 30-х годах наблюдали готику растений картофеля, сопровождающуюся образованием клубней веретеновидной и грушевидной формы [2]. В энциклопедии американского фитопатологического общества в качестве одного из вариантов названия упоминается "tomato bunch top" — кустистость верхушки томата [3].

Возбудитель болезни, круг хозяев

Возбудитель болезни виroid веретеновидности клубней картофеля (ВВКК) в английском варианте "PSTVd — Potato Spindle Tuber Viroid" представляет собой замкнутую в кольцо молекулу РНК из 359 нуклеотидов [1], МВ 100000-125000 [3] с высокой степенью внутримолекулярной комплементарности [1]. Температурная инактивация возбудителя происходит через 10 мин. при 75-80 °С, в фенольных растворах — при 90-100 °С [3]. Дифференцируют 3 штамма (=strain) ВВКК, которые отличаются 6-10 нуклеотидами [1]: severe — суровый, вызывающий потерю урожая до 65% [3]; intermediate — промежуточный и mild — мягкий с потерей урожая в пределах 15-25% [3]. Согласно Т.О.Диенер (1979) ВВКК способен реплицироваться в 156 видах растений из 12 семейств, 139 из которых относятся к Solanaceae [1]. При этом многие виды Solanaceae инфицированы бессимптомно [3].

The paper presents short review about PSTVd: names of the disease; causal agent and host range; symptoms of disease on potato; visual diagnosis of PSTVd; conditions for disease development; pathways of PSTVd contamination; geographic distribution and technique of PSTVd eradication; methods of PSTVd identification. The results of NASH test of BRIP collection in vitro of cultivars and potato wild species on presence of PSTVd are presented at the end of paper. NASH test was conducted in collaboration with CIP (Lima, Peru). BRIP collection in vitro of initial forms for breeding and seed-growing is free from PSTVd.

Симптомы болезни на картофеле

Симптомы болезни на картофеле согласно описанию, данному в энциклопедии фитопатологического общества Америки [3], следующие.

Для надземной части растения характерны прямостоячие тонкие стебли и цветоножки, которые длиннее, чем у здоровых растений; более мелкие доли листа с волнистыми краями и тенденцией изгибаться внутрь, перекрывая конечную долю; более острые углы между стеблями и черенками; листья вблизи почвы заметно короче и прямостоячие, контрастируя со здоровыми растениями. Листья которых лежат на земле; тусклая листовая поверхность. Более яркие симптомы наблюдаются при заражении суровым штаммом, вызывающим непятнистую курчавую карликовость растений картофеля. Клубни больных растений удлиненные, круглые в поперечном сечении с заостренным концом, уродливые. Круглое поперечное сечение по контрасту с уплощенным является диагностической чертой. Сетчатая кожура клубней становится гладкой, красная — розовой, фиолетовая — бледно-лиловой. Глазки у больных клубней более многочисленные с выступающими бровями. Вокруг чечевичек часто появляются некротические пятна. На поверхности клубней трещины располагаются параллельно главной оси. Может наблюдаться некротизация ткани клубня.

Визуальная идентификация ВВКК

Визуальная идентификация больных растений и клубней возможна лишь при поражении суровым штаммом и на более поздних стадиях развития болезни. Не все клубни больных растений проявляют все или даже любой из перечисленных симптомов заболевания [3]. Подобная

ситуация наблюдалась российскими учеными на сорте Невский, когда внешне здоровые клубни были инфицированы ВВКК согласно трем тестам: молекулярная гибридизация виroidной РНК с кДНК; электрофорез суммарной низкомолекулярной РНК в ПААГ; использование растений-индикаторов: томат сорта Rutgers и скополия [4]. Однако клубни некоторых здоровых растений похожи на веретеновидные [3]. Случаи массового проявления различных аномалий на клубнях встречаются в процессе размножения картофеля в тепличных условиях [4]. Считается, что отбор веретеновидных клубней картофеля сортировкой неэффективен [3].

Условия проявления болезни

Высокие температуры стимулируют размножение ВВКК [5,6] и проявление симптомов, низкие сохраняют инфицированность клубней на одном уровне. Болезнь более широко распространяется во влажных условиях, чем в сухих [6].

Пути заражения ВВКК

ВВКК распространяется механическим путем при контакте больных и здоровых растений через посредство человека или при использовании одних и тех же орудий труда [1,3]; при инокуляции соком больных растений [1] и в меньшей степени насекомыми [1,3,5]. Среди насекомых, участвующих в распространении виroidа W.J.Hooper, в энциклопедии 1981 г. отмечены журующие [3]. L.F.Salazar в обзоре 1989 г. приводит единичные ссылки на перенос виroidа кобылками (*Melanoplus* sp.), жуками-блошками (*Epitrix cucumeris* и *Systema elongata*), луговым клопиком (*Lygus pratensis*), личинками колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*), жуком-листоедом (*Dysonicha triangularis*) и из тлей — большой картофельной тлей (*Macrosiphum euphorbiae*) [1]. Возможность заражения ВВКК с помощью персиковой тли (*Myzus persicae*) или обыкновенной картофельной тли (*Aulacorthum solani*) первоначально отрицалась [1]. Впоследствии (M.Querci et. al., 1997 [7]; J. Syller, 2000 [8]) было продемонстрировано распространение виroidа персиковой тлей в случае капсулирования ВВКК белками вируса картофеля L. Более того, по данным J.Syller [8], в некоторых случаях вирус L может действовать только как переносчик виroidа, не вызывая вирусного инфицирования растений.

ВВКК относится к числу возбудителей, переносимых пылью [3, 5] и ботаническими семенами [1, 3, 5]. В частности, распространение виroidа веретеновидности в Китае предполагается отчасти обусловленным размножением картофеля настоящими семенами [1]. К.А.Можаявой с коллегами (1996 [9]) продемонстрировано заражение виroidом через корневую систему при совместном выращивании больных и здоровых растений томата на гидропонной установке.

Дополнительным путем инфицирования виroidом веретеновидности, обусловленном его свойствами, является оздоровление сортов картофеля с применением высокой температуры (горячая термотерапия) [5] и вегетативное размножение бессимптомных образцов в культуре *in vitro* и в условиях теплицы. Этот путь может быть от-

ветственен за распространение ВВКК в России [10, 11].

Распространение ВВКК может происходить посредством обмена генетическим материалом без надлежащей сертификации. Зараженные виroidом образцы были обнаружены в государственной коллекции картофеля Великобритании (Commonwealth Potato Collection) [1]; коллекции сортов и селекционных образцов картофеля института селекции и акклиматизации растений (IHAR), депонируемой в культуре *in vitro* в Бонине, Польша [12]; базисной для семеноводства России коллекции сортообразцов картофеля [13]. Инфицирование виroidом через селекционный материал было выявлено в Австралии [1]. В России не прошедший надлежащей сертификации исходный материал был использован для генетической трансформации картофеля. В результате ВВКК был выявлен в продуктах новейших технологий — трансгенных растений картофеля [14].

Географическое распространение ВВКК и пути освобождения от виroidа

ВВКК обнаружен в США [1, 3], Канаде [1, 3, 5], Китае [1, 7], Польше [12], Австралии [1], СССР [1-3], России [10, 11, 13]. Появились сообщения о наличии ВВКК на посевах картофеля в Беларуси [15, 16].

Широкое распространение виroidа веретеновидности клубней картофеля почти во всех провинциях Канады наблюдалось в начале 20-х годов XX века. В 1979–1980 гг. ВВКК в Канаде уже не было [6]. Успешное освобождение от виroidа было достигнуто за счет ряда улучшений в системе семеноводства картофеля, включающих развитие быстрых и чувствительных методов диагностики ВВКК, обеспечение производящих элитные семена ферм исходным материалом экстракласса, создание программ получения свободного от вирусов и виroidов материала с использованием культуры тканей, совершенствование правовой базы семенной сертификации, проверку селекционного материала картофеля до его передачи в семеноводство. В Канаде также введена обязательная проверка исходного материала на ВВКК до вовлечения его в селекционный процесс. Проводится проверка коммерческого картофеля. При обнаружении ВВКК весь картофель уничтожается и проводится дезинфекция фермы [6].

Освобождение картофеля от сурового и мягкого штаммов ВВКК достигалось 6-месячной инкубацией инфицированных клубней в условиях холодильника (6-7 °С) с последующим вычленением меристемы. От 18,5 до 80% тепличных растений из меристем инфицированных клубней сортов Azalia и Irys были свободны от ВВКК после подобной холодовой термотерапии согласно тесту на томатах сорта Rutgers и методу электрофореза в ПААГ [17]. Российские ученые отмечают положительный эффект при терапии сортов от ВВКК воздействием пониженных положительных температур (+2 °С) на растения из микроочеренков *in vitro* в течение 1-3 месяцев [18].

Методы диагностики ВВКК

Сложность своевременного выявления ВВКК помимо недостаточности четких внешних симптомов болезни и

отсутствия белковой оболочки у возбудителя определяется низкой концентрацией вирусной РНК в растениях (0,1-0,5 мкг/г ткани [5]).

В настоящее время известны 5 методов диагностики. Из них два относятся к биотестам.

1. Тест на томатах [1, 19]

Обычно используется томат сорта Rutgers. Белорусскими учеными продемонстрированы диагностические симптомы ВВКК на сортах томата Доходный и Перамога [16].

1а. Нормальный тест

Молодые листья томата механически инокулируют соком анализируемых образцов. Через 2-4 недели выращивания растений в теплице при высокой интенсивности света и температуре не ниже 30 °С появляются характерные симптомы: эпинастия (искривление побега в нижней его части в процессе роста), морщинистость и складчатость листьев (позднее скручивание), карликовость, некрозы жилок. Четкие симптомы наблюдаются только в случае зараженности суровым штаммом. При инфицированности мягким штаммом больные растения трудно отличить от здоровых.

1б. Тест Yang и Hooker [1, 19]

Механически инфицированные растения томата выращивают при 24-30 °С и непрерывном освещении в пределах 1 клк (100 ft-c [19]). Зараженные ВВКК растения томата проявляют альбицизм с изгибом листьев, а в случае сурового штамма дополнительно некроз жилок [19].

1в. Challenge тест [1, 19]

Модификация 1а. Позволяет различать заражение мягким и суровым штаммами ВВКК. Метод основан на перекрестной защите растений томата, инфицированных мягким штаммом, от заражения суровым.

2. Тест на *Scopolia sinensis*

Скополия реагирует на заражение ВВКК появлением локальных некрозов на листьях через 8-14 дней выращивания в строго контролируемых условиях при умеренном освещении в пределах 3-4 клк, температуре 18-23 °С [1, 19] и влажности выше 60% [1].

3. Электрофорез в ПААГ

Электрофоретическое разделение низкомолекулярной РНК, выделенной из анализируемых растений в полиакриламидном геле (ПААГ) с использованием в качестве положительного контроля вирусной РНК, является менее чувствительным методом, чем тест на томатах [1, 19]. Увеличение чувствительности метода достигается использованием растений-накопителей ВВКК (томат сорта Rutgers), которые предварительно инокулируются соком анализируемых образцов. Через 2-3 недели из растений томата выделяют РНК и разделяют электрофорезом в ПААГ. Применение двунаправленного или возвратного электрофореза позволяет обнаружить до 800 пкг вирусной РНК на 1 г ткани или 80 пкг/слот геля [20]. В этом случае первый электрофорез проводится в нативных условиях, второй — в денатурирующих.

4. Гибридизация нуклеиновых кислот

Тест основан на способности ВВКК — кДНК образовывать гибрид с молекулой ВВКК, иммобилизованной на жидкой или твердой мембране [19]. Образование гибри-

да выявляется с помощью радиоактивной, ферментной или флуоресцентной метки [1, 19]. Вариант метода — NASH (nucleic acid spot hybridization) с использованием радиоактивной метки, разработанный L. Salazar с коллегами, позволяет обнаружить 0,33 пг вириона [21]. Недавно российскими учеными было предложено использовать в качестве метки диен-платину [22]. Чувствительность определения рекомбинантной плазмиды разработанным ими способом составляет 0,3 пг.

5. RT-PCR (=ОТ-ПЦР)

Метод, совмещающий реакцию обратной транскрипции с амплификацией в полимеразной цепной реакции (RT-PCR), является наиболее чувствительным для обнаружения крайне низкого уровня инфицирования патогенами РНК-ой природы. Он применим в случаях, когда уровень инфекции ниже предела чувствительности метода гибридизации нуклеиновых кислот (NASH) и позволяет обнаружить единичную копию гена [23]. Продукт реакции амплификации обнаруживается визуально после электрофоретического разделения в ПААГ или агарозном геле.

Результаты тестирования коллекции сортов и диких видов картофеля БелНИИК, депонируемой *in vitro*

Тестирование коллекции *in vitro* методом NASH было проведено совместно с лабораторией молекулярной ви-

Таблица 1. Сорта картофеля коллекции *in vitro* БелНИИК, свободные от ВВКК согласно тесту NASH (БелНИИК — СР, Лима, Перу; март-апрель 1999 г., июнь-июль 1999 г.)

Белорусские сорта	Иностранные сорта	
Альтаир	Adler	
Архидея*	Delikat	
Атлант	Коретта	Германия
Белорусский 3	Карлена	
Выток*	Kranich	
Верас	Molli	
Дельфин	Импала	
Дина	Никита	Голландия
Живица	Сантэ*	
Лазурит*	Фреско*	
Ласунок*	Кесин	
Лошицкий	№ 303	Китай
Орбита	Янсу	
Пригожий	Детскосельский	
Росинка	Невский	Россия
Синтез*	Седневский	
Скарб*	ранний	
Сузорье	Кобза	
Темп	Луговской*	Украина
Явар*	Символ	
Яхант		

Примечание: * — сорта, дополнительно тестированные методом RT-PCR. (Высший агробиотехнологический колледж, г. Пушино Московской обл.; декабрь 1998 г.)

рологии отдела защиты сельскохозяйственных культур Международного центра картофеля (CIP, Lima), возглавляемого Luis F. Salazar. Из CIP были получены нитроцеллюлозные мембраны № 543, 544 на 150 образцов каждая, на которые согласно приложенному протоколу были нанесены нуклеиновые кислоты, выделенные из растений *in vitro*. В качестве положительного контроля использованы зараженные ВВКК образцы сорта Сантэ, любезно предоставленные Ж.В. Блоцкой. Мембраны с нанесенными образцами были отправлены в CIP для дальнейшего анализа с помощью радиоактивной метки. Результаты тестирования, полученные в апреле и июле 1999 г., свидетельствовали об отсутствии ВВКК в нанесенных образцах за исключением положительных контролей.

Списки коллекции *in vitro* сортов, а также диких и примитивных видов картофеля, свободных от ВВКК согласно тесту NASH, приведены в таблицах 1 и 2 соответственно. Ряд сортов коллекции *in vitro* проверен методом RT-PCR в агробиотехнологическом колледжег. Пушкино Московской области (помечены звездочкой). ВВКК не обнаружен и этим более чувствительным методом. Таким образом, исходный материал для селекции и семеноводства, депонируемый в БелНИИК *in vitro*, не содержит ВВКК.

Литература

1. Salazar L.F. Potato Spindle Tuber // Plant Protection and Quarantine. Vol. II: Selected Pests and Pathogens of Quarantine Significance (ed. Robert P. Kahn) – Unated States, 1989. – Chapter 11. – P. 155-167.

2. Леонтьева Ю.А. Веретеновидность клубней (готика) – одно из основных вирусных заболеваний картофеля в Поволжье: Автореф. дис... докт. биол. наук / Ленинградский сельскохозяйственный институт. – Пушкин, 1971. – 43 с.

3. Hooker W.J. Potato Spindle Tuber Viroid // Compendium of Potato Diseases (ed. Hooker W.J.) / American Phytopathological Society, 1981. – 121 p.

4. Вириод веретеновидности клубней и оздоровление картофеля / Кастальева Т.Б., Можаяева К.А., Писецкая Н.Ф. и др. // Вестник РАСХН. – 1992. – №3. – С. 3-5.

5. Sanger H.L. Biology, Structure, Functions and Possible Origin of Viroids // Nuclear Acids and Proteions in Plant. II Structure, Biochemistry and Physiology of Nucleic Acids (eds. B. Parthier and D. Boulter): Enycl. of Plant Physiology. New – Vol. 14B. – P. 368-454.

6. Singh S.P. Occurence, Diagnosis and Eradication of the Potato Spindle Tuber Viroid from Canada // Viroids of Plants and their Detection: Intern. Seminar (Warsaw, 12-20 August 1986) / Warsaw Agricultural University. – Warsaw, 1988. – P. 37-41.

7. Evidence for heterologous encapsidation of potato spindle tuber viroid in particles of potato leafroll virus. / Querci M., Owens R.A., Bartoline I. e. a. // J. Gen. Virology. – 1997. – Vol. 78. – P. 1207-1211.

8. Syller J. The effects of the interaction between potato leafroll virus and potato spindle tuber viroid transmission by aphids and plant response. // Breeding Research for Resistance to pathogens and for Quality Traits: The Section Meeting

Таблица 2. Коллекция *in vitro* диких и примитивных видов картофеля БелНИИК, свободная от ВВКК согласно тесту NASH (БелНИИК — CIP, Лима, Перу)

Вид	Количество индивидуальных образцов коллекции БелНИИК
1. <i>S. berthaultii</i>	5
2. <i>S. simplicifolium</i>	2
3. <i>S. microdontum</i>	2
4. <i>S. vernei</i>	34
5. <i>S. spagazzini</i>	6
6. <i>S. oplocense</i>	3
7. <i>S. phureja</i>	4
8. <i>S. stenotomum</i>	1
9. <i>S. andigenum</i>	1
10. <i>S. fendleri</i>	4
11. <i>S. stoloniferum</i>	4
12. <i>S. polytrichon</i>	1
13. <i>S. hjertingii</i>	2
14. <i>S. demissum</i>	4
15. <i>S. verrucosum</i>	3
16. <i>S. querreroense</i>	1
17. <i>S. hougasii</i>	2
18. <i>S. polyadenium</i>	9
19. <i>S. jamesii</i>	5
20. <i>S. pinnatisectum</i>	5
21. <i>S. bulbocastanum</i>	5
22. <i>S. cardiophyllum</i>	1
23. <i>S. chacoense</i>	3
24. <i>S. tarijense</i>	13
25. <i>S. acaule</i>	6
26. <i>S. michoacanum</i>	2
27. <i>S. abancayense</i>	13
28. <i>S. hondelmanii</i>	5
29. Дигиплоид Ласунка	1
30. <i>S. ricki</i>	1
31. <i>S. caripense</i>	5
32. <i>S. brevidens</i> × <i>S. etuberosum</i>	2
33. <i>S. etuberosum</i> × <i>S. brevidens</i>	3
Соматические гибриды	
34. <i>S. tuberosum</i> + <i>S. brevidens</i> × <i>S. etuberosum</i>	13
35. <i>S. tuberosum</i> + <i>S. bulbocastanum</i>	19
36. <i>S. etuberosum</i> × <i>S. brevidens</i> + <i>S. polyadenium</i>	1

(Warsaw, Poland, July 3-7, 2000) / Warsaw, 2000. – P. 16-17.

9. Можаяева К.А., Васильева Т.Я., Кастальева Т.Б. Заражение томатов вириодом веретеновидности // Вестник РАСХН. – 1996. – № 3. – С. 57-58.

10. Можаяева К.А., Васильева Т.Я., Кастальева Т.Б. Распространение вириода веретеновидности клубней при получении безвирусного картофеля // Защита растений в условиях реформирования агропромышленного комплекса: экономика, эффективность, экологичность: Тез. докл.

Всероссийского съезда по защите растений. Санкт-Петербург, декабрь, 1995 г. – Санкт-Петербург, 1995. – С. 67.

11. Романова С.А., Леднева В.А. Вирусные, виroidные и микоплазменные болезни, поражающие оздоровленный картофель на Дальнем Востоке // Защита растений в условиях реформирования агропромышленного комплекса: экономика, эффективность, экологичность: Тез. докл. Всероссийского съезда по защите растений. Санкт-Петербург, декабрь, 1995 г. – Санкт-Петербург, 1995. – С. 80-81.

12. Zsolyi banku genow in vitro, Instytut hodowlii aklimatyzacji roslin oddzial w Boninie. – Bonin, 1998. – 41 p.

13. Молекулярная диагностика зараженности оздоровленных сортов картофеля виroidом веретеновидности клубней / Дрыгин Ю.Ф., Мусин С.М., Кондакова О.А. и др. // Доклады Россельхозакадемии. – 1996. – № 6. – С. 24-25.

14. Можасва К.А. Виroidы и трансгенные растения // Новые направления биотехнологии: Тез. докл. VIII конференции. Москва, 27-29 апреля 1998 г. / Научный совет РАН по проблемам биотехнологии. Центр "Биоинженерия" РАН. Московская медицинская академия им. М.М. Сеченова. Информационный центр по биотехнологии. – Москва, 1998. – С. 16.

15. Блоцкая Ж.В., Берлинчик Е.Е. Распространенность виroidа веретеновидности клубней картофеля (ВВКК) в Беларуси // Известия Академии аграрных наук Республики Беларусь. – 1997. – № 1. – С. 39-41.

16. Берлинчик Е.Е. Диагностика виroidа веретеновидности клубней картофеля визуальным и индикаторным методами // Весці Акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 1997. – № 3. – С. 50-52.

17. Paduch-Cichal E., Kryczynski S. A low temperature therapy and meristem-tip culture for eliminating four viroids from infected plants. // Viroids of Plants and their Detection: Intern. Seminar (Warsaw, 12-20 August 1986) / Warsaw Agricultural University. – Warsaw, 1988. – P. 137-144.

18. Мусин С.М., Бойко В.В., Усков А.И. Диагностика и терапия виroidа веретеновидности клубней картофеля // Защита растений в условиях реформирования агропромышленного комплекса: экономика, эффективность, экологичность: Тез. докл. Всероссийского съезда по защите растений. Санкт-Петербург, декабрь, 1995 г. – Санкт-Петербург, 1995. – С. 348.

19. Detection / PSTVd // Basic techniques in plant virology: Technical training unit 1. – International Potato Center (CIP), 1993 – 3.4. (34.1 – 34.5) – 19 p.

20. Diagnostic procedure for detection of viroids and viruses with circular RNAs by "return" – gel electrophoresis / Schumacher J., Meyer N., Riesner D. e.a. // J. Phytopathology. – 1986. – Vol. 115. – P. 332-343.

21. Salazar L.F., Balbo I., Owens R.A. Comparison of four radioactive probes for the diagnosis of potato spindle tuber viroid by nucleic acid spot hybridization // Potato Research. – 1988. – Vol. 31. – P. 431-442.

22. Кондакова О.А., Дрыгин Ю.Ф. Диагностика виroidного заболевания картофеля зондами (диен) Рт-ДНК // Биотехнология. – 1999. – № 4. – С. 83-91.

23. Querci M., Salazar L. F. Molecular probes for the detection of virus/viroid in potato / Molecular Virology Laboratory, Pathology Department. The International Potato Center. – Lima, Peru, P.O. Box 1558, 1999 – 21 p.