

Мозаичные вирусы картофеля, поражающие растения клубненосных видов рода *Solanum* L. в полевом генном банке ВИР

Е.В. Рогозина¹✉, Н.В. Мироненко², Н.А. Чалая¹, Ю. Мацухита³, Х. Янагисава⁴

¹ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

² Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт овощеводства и цветоводства Национальной организации сельского хозяйства и исследований пищевых продуктов, Цукуба, Япония

⁴ Центральный сельскохозяйственный научно-исследовательский центр Национальной организации сельского хозяйства

и исследований пищевых продуктов, Цукуба, Япония

✉ e-mail: erogozina@vir.nw.ru

Вирусные болезни наносят большой ущерб картофелеводству, и особую проблему повсеместно представляет вирус картофеля Y (potato virus Y – PVY), отличающийся разнообразием штаммового состава. Для создания отечественных сортов картофеля (*Solanum tuberosum* L.), устойчивых к вирусным болезням, исходным материалом служат дикие и культурные клубнеобразующие виды рода *Solanum* L., сохраняемые в коллекции генетических ресурсов картофеля ВИР. Сохранение и рациональное использование коллекции основано на регулярном фитосанитарном мониторинге, в том числе карантинных объектов, в первую очередь – вириода веретеновидности клубней картофеля (potato spindle tuber viroid – PSTVd). Цель работы – обследование растений клубненосных видов *Solanum* L. в полевом генном банке ВИР на наличие PSTVd и мозаичных вирусов PVX (potato virus X), PVS (potato virus S), PVM (potato virus M) и PVY, наиболее распространенных на картофеле в Северо-Западном регионе Российской Федерации. Обследованы клоновые растения 137 генотипов, представляющие 31 вид секции Petota рода *Solanum* L. Диагностика проведена методами ELISA, ОТ-ПЦР и растений-индикаторов. Среди изученных растений PSTVd не обнаружен, но диагностировано массовое поражение мозаичными вирусами, более половины тестированных клонов инфицировано двумя и более вирусами. Выявлено 17 генотипов (12 %) с отрицательной реакцией ELISA на PVX, PVS, PVM и PVY. Различия в поражении мозаичными вирусами растений *Solanum* spp., относящихся к разным филогенетическим группам, статистически значимы (по критерию χ^2 Пирсона). Среди исследованных генотипов южноамериканских видов доля пораженных PVY достоверно больше, чем среди генотипов североамериканских видов ($\chi^2 = 4.56, p = 0.03$), PVX, напротив, чаще детектирован у генотипов из группы североамериканских видов ($\chi^2 = 8.81, p = 0.003$). Штаммы PVY идентифицировали у 37 генотипов *Solanum* spp. методом мультиплексной ОТ-ПЦР. Выявлено 27 генотипов, пораженных обычным штаммом PVY^O, по одному генотипу – пораженные штаммами PVY^{NW} (A) и PVY^{NW} (B), семь генотипов, пораженных смесью штаммов PVY^O + PVY^{NW} (A), и один – смесью штаммов PVY^O + PVY^{NTN-NW} (SYRI) и SYRIII. Рекомбинантные штаммы PVY^{NW} (A), PVY^{NTN-NW} (SYRI) и SYRIII впервые обнаружены в Северо-Западном регионе Российской Федерации. Обсуждается согласованность результатов диагностики штаммов PVY разными (иммунологический, молекулярный и биологический) методами.

Ключевые слова: дикие клубненосные *Solanum* spp.; вириод веретеновидности клубней картофеля; мозаичные вирусы картофеля; штаммы PVY; рекомбинантные изоляты; ELISA; ОТ-ПЦР; растение-индикатор; смешанная инфекция.

Для цитирования: Рогозина Е.В., Мироненко Н.В., Чалая Н.А., Мацухита Ю., Янагисава Х. Мозаичные вирусы картофеля, поражающие растения клубненосных видов рода *Solanum* L. в полевом генном банке ВИР. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(3):304-311. DOI 10.18699/VJ19.495

Potato mosaic viruses which infect plants of tuber-bearing *Solanum* spp. growing in the VIR field gene bank

E.V. Rogozina¹✉, N.V. Mironenko², N.A. Chalaya¹, Yu. Matsushita³, H. Yanagisawa⁴

¹ Federal Research Center The N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

² All-Russian Institute of Plant Protection, Pushkin, St. Petersburg, Russia

³ Institute of Vegetable and Floriculture Science, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Japan

⁴ Central Region Agricultural Research Center, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Japan

✉ e-mail: erogozina@vir.nw.ru

Potato crop is particularly affected by virus diseases, and potato virus Y (PVY) currently considered the most important pathogen distributed worldwide as a diversity of strains. Wild and cultivated tuber-bearing species of the genus *Solanum* L., stored in the VIR collection, are used as the initial material in creation domestic potato varieties (*Solanum tuberosum* L.) resistant to virus diseases. The preservation and rational utilization of the potato collection is based on regular phytosanitary monitoring, including quarantine objects, foremost PSTVd (potato spindle tuber viroid). The aim of the work is to examine plants of tuber-bearing *Solanum* species in the field gene bank of VIR for the presence of PSTVd and PVX (potato virus X),

PVS (potato virus S), PVM (potato virus M) and PVY (potato virus Y), which are the most common viruses on potatoes in the North-West District of Russia. We examined clonal plants of 137 genotypes representing 31 species of the section Petota of the genus *Solanum* L. A diagnostic was carried out using ELISA, RT-PCR and indicator plants. No PSTVd was found in the studied plants, but a plural infestation by mosaic viruses was detected, more than half of the tested clones are infected with two or more viruses. In the studied samples, only 17 genotypes (12 %) are not infected by PVX, PVS, PVM and PVY according to the ELISA test. There are statistically significant differences in the virus infestation of *Solanum* species with different origins, according to Pearson's chi-squared test. Among the studied genotypes of wild relatives of potatoes, the proportion of those affected by PVY was significantly higher in the South American than in the North American species ($\chi^2 = 4.56$, $p = 0.03$); the proportion of genotypes affected by PVX was significantly higher in the North American species ($\chi^2 = 8.81$, $p = 0.003$), the critical value was $\chi^2 = 3.841$. PVY strains were identified by multiplex RT-PCR in 37 genotypes of *Solanum* spp. We found that 27 genotypes are infected by a common PVY⁰ strain, two genotypes are infected by PVY^{NW} (A) and PVY^{NW} (B) strains, respectively, seven genotypes are infected by a mixture of PVY⁰ + PVY^{NW} (A) strains, and one is infected by a mixture of PVY⁰ + PVY^{NTN-NW} (SYRI) + SYRIII strains. The recombinant strains of PVY are detected in the North-West District of Russia for the first time. Coherency of the results of PVY strains detection by various (immunological, molecular and biological) methods is discussed.

Key words: wild tuber-bearing *Solanum* spp.; potato spindle tuber viroid; potato mosaic viruses; PVY strains; recombinant strains; ELISA; RT-PCR; indicator plant; mixed infection.

For citation: Rogozina E.V., Mironenko N.V., Chalaya N.A., Matsushita Yu., Yanagisawa H. Potato mosaic viruses which infect plants of tuber-bearing *Solanum* spp. growing in the VIR field gene bank. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(3):304-311. DOI 10.18699/VJ19.495 (in Russian)

Введение

В условиях изменяющегося климата для обеспечения населения Земли продовольствием необходимо устойчивое сельскохозяйственное производство разнообразных продуктов питания высокого качества и в достаточном объеме.

Одна из ведущих сельскохозяйственных культур в мировом земледелии – картофель – вегетативно размножаемая культура, уязвимая для вирусных инфекций. Известно не менее 40 видов вирусов, поражающих картофель (Potato Biology..., 2007), из которых 6 наиболее вредоносны и распространены повсеместно: вирус скручивания листьев картофеля (potato leaf roll virus – PLRV) и мозаичные вирусы: вирус картофеля X (potato virus X – PVX), вирус картофеля S (potato virus S – PVS), вирус картофеля M (potato virus M – PVM), вирус картофеля A (potato virus A – PVA) и вирус картофеля Y (potato virus Y – PVY). Вирусные болезни, в особенности возникающие при смешанных инфекциях PVY и других вирусов мозаичной группы, приводят к существенным потерям в товарном производстве и затрудняют процесс семеноводства. PVY отличается разнообразием штаммов, среди которых различают пять нерекомбинантных и более трех десятков рекомбинантных (Green et al., 2018). Во многих странах, где выращивают картофель, в том числе в Российской Федерации, в последние годы отмечено значительное распространение, иногда доминирование, рекомбинантных штаммов PVY (Karasev, Gray, 2013; Усков и др., 2016; Green et al., 2017). Рекомбинантные изоляты PVY представляют особую проблему для картофелеводства, так как многие из них вызывают некротические поражения или трещиноватость клубней картофеля.

Экологически безопасная и эффективная стратегия защиты картофеля от вирусных инфекций основана на создании и внедрении в производство устойчивых сортов. Исходным материалом для селекции картофеля на устойчивость к вирусным болезням служат дикие и культурные клубнеобразующие виды рода *Solanum* L. В сравнении с другими сельскохозяйственными растениями картофель имеет наибольшее число дикорастущих клубненоносных

видов-сородичей (Vincent et al., 2013). Сегодня в мире, по данным ФАО, 30 стран поддерживают обширные *ex situ* коллекции картофеля, в которых сохраняется около 98 тыс. образцов (Machida-Hirano, 2015). Коллекция генетических ресурсов картофеля ВИР – одна из наиболее представительных: в ней около 8 тыс. образцов диких, примитивных и культурных видов, сортов и селекционных клонов картофеля. Важным аспектом работы по сохранению и воспроизводству образцов культурных форм и дикорастущих родичей картофеля являются фитосанитарный мониторинг коллекции и контроль над нераспространением карантинных объектов, в первую очередь вириода веретеновидности клубней картофеля (potato spindle tuber viroid – PSTVd). PSTVd передается контактно, с соком инфицированных растений или ботаническими семенами, которые становятся инфицированными, если формируются у растений с зараженной пылью или семяпочками. Кроме сортового картофеля, большую опасность PSTVd представляет для столоно- и клубнеобразующих *Solanum* spp., образцы которых сохраняются в коллекциях генных банков (Jeffries, 1998). Цель проведенного нами исследования – мониторинг PSTVd и PVX, PVS, PVM и PVY (мозаичные вирусы, наиболее распространенные на картофеле в Северо-Западном регионе Российской Федерации) на растениях диких клубненоносных *Solanum* spp. в полевом генном банке ВИР.

Материалы и методы

Изучены 137 растений, представляющих 31 вид клубненоносных дикорастущих *Solanum* spp., относящихся к североамериканской группе, серии: Demissa Buk. (*S. iopetalum*), Longipedicellata Buk. (*S. fendleri*, *S. hjertingii*, *S. papita*, *S. polytrichon*, *S. stoloniferum*), Pinnatisecta Rydb. (*S. jamesii*, *S. pinnatisectum*), Cardiophylla Buk. (*S. cardiophyllum*, *S. ehrenbergii*) и южноамериканской группе, серии: Acaulia Juz. (*S. acaule*), Yungasensia Corr. (*S. arnezii*), Glabrescentia Buk. (*S. chacoense*), Bukasoviana Gorbat. (*S. alandiae*, *S. avilesii*, *S. gourlayi*, *S. hondelmannii*, *S. kurtzianum*, *S. leptophyes*, *S. okadae*, *S. oplocense*, *S. sparsipilum*, *S. spegazzinii*, *S. venturii*, *S. vernei*), Tarijensia Corr.

Таблица 1. Классификация штаммов PVY согласно мультиплексной ОТ-ПЦР (Chikh Ali et al., 2010)

Размер диагностических продуктов амплификации, п. н.	Идентифицированный штамм PVY
853 + 532	PVY ^O
1307 + 633 + 398	PVY ^N
1307	NA-PVY ^N
853 + 633 + 441	PVY ^{NW} (A)
853 + 441	PVY ^{NW} (B)
1307 + 633 + 441	PVY ^{NTN} (A)
1307 + 441	PVY ^{NTN} (B)
1076 + 633 + 441	PVY ^{NTN-NW} (SYRI)
1076 + 441	PVY ^{NTN-NW} (SYRII)
1076 + 441 + 278	SYRIII

(*S. berthaultii*, *S. neocardenasii*, *S. tarjense*), *Simpliciora* (Buk.) Gorbat. (*S. microdontum*, *S. simplicifolium*) и *Maglia* Bitt. (*S. molinae*). Названия видов приведены согласно классификации С.М. Букасова (1978) и Л.Е. Горбатенко (1990).

Виды были представлены 2–16 генотипами, сохраняемыми как клоновые растения. Изученные генотипы *Solanum* spp. составляют признаковую коллекцию диких родичей картофеля, охарактеризованных по устойчивости к фитопатогенам и наличию маркеров соответствующих R-генов устойчивости (Рогозина и др., 2014), или входят в состав рабочей коллекции генотипов, изучаемых по комплексу селекционно-ценных признаков. Тестировали растения в полевых условиях, используя для посадки клубневую репродукцию, полученную в защищенном грунте.

Диагностика вириода. Тотальную РНК выделяли из 100 мг свежих листьев растений дикорастущих *Solanum* spp. с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Германия), следуя рекомендациям производителя. Использовали РНК для идентификации вириода PSTVd методом ОТ-ПЦР в реальном времени, согласно протоколу (Yanagisawa et al., 2017) с помощью набора праймеров 6Pospi-F и 6Pospi-R. В качестве положительного контроля взяли растение картофеля сорта Осень, инфицированное вириодом PSTVd и сохраняемое в коллекции Всероссийского научно-исследовательского института картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха (ВНИИКХ).

Диагностика вирусов. Метод ELISA в модификации «двойной сэндвич» (Clark, Adams, 1977) применяли для детекции вирусов PVX, PVS, PVM и PVY в листьях растений дикорастущих *Solanum* spp. Использовали диагностические наборы НПО «Биотехнология» ВНИИКХ им. А.Г. Лорха (Коренево, Московская область).

Дополнительную детекцию PVY проводили с помощью метода ОТ-ПЦР со специфичными праймерами (San et al., 2009). Штаммовый состав PVY определяли методом мультиплексной ОТ-ПЦР с использованием набора из 12 праймеров (Logenzen et al., 2006), который позволяет идентифицировать 10 отдельных штаммов: PVY^O, PVY^N, NA-PVY^N, PVY^{NW} (два генотипа), PVY^{NTN} (два генотипа), PVY^{NTN-NW} (два генотипа) и SYRIII (табл. 1),

а также случаи смешанного заражения этими штаммами (Chikh Ali et al., 2010). Для ОТ-ПЦР использовали набор Kit Prime Script One Step RT-PCR (TaKaRa, Япония), ПЦР продукты разделяли в агарозных гелях и окрашивали бромистым этидием.

Тест на растениях-индикаторах *Nicotiana tabacum* L. (сорт Самсун) проводили для верификации результатов ОТ-ПЦР по диагностике и определению штаммового состава PVY (Jeffries, 1998).

Результаты

Диагностика PSTVd. Тестирование 137 генотипов 31 вида дикорастущих клубнеобразующих *Solanum* spp. методом RT-PCR не выявило PSTVd в исследуемых образцах листовой ткани, за исключением положительного контроля. Полученные результаты согласуются с ранее проведенной диагностикой PSTVd других генотипов дикорастущих *Solanum* spp. из коллекции ВИР (Т.Б. Кастальева, устное сообщение) и свидетельствуют об отсутствии PSTVd среди образцов коллекции дикорастущих видов картофеля в полевом генном банке ВИР.

Диагностика мозаичных вирусов картофеля. У растений клубненосных дикорастущих *Solanum* spp., тестированных методом ELISA, выявлено массовое поражение PVX, PVS, PVM и PVY (табл. 2).

Не были инфицированы мозаичными вирусами только 17 (12 % протестированных) генотипов, относящихся к видам: *S. acaule* (к-23004), *S. cardiophyllum* (к-16827, к-16828), *S. gourlayi* (к-11446, к-12416), *S. hjertingii* (к-23366), *S. hondelmanii* (к-20023), *S. leptophyes* (к-5764), *S. polytrichon* (к-19164, к-24410), *S. sparsipilum* (к-9798, к-19344), *S. spagazzinii* (к-11422, к-11975, к-12688), *S. stoloniferum* (к-24420) и *S. vernei* (к-11447). Следует заметить, что у других генотипов *S. acaule* (к-23004) и *S. vernei* (к-11447) были детектированы PVY и смешанная инфекция PVY и PVS соответственно. Установлено, что клоны *Solanum* spp., отобранные как источники устойчивости к фитофторозу или золотистой нематоде, поражены моноинфекцией или смесью PVX, PVS и PVY.

Наибольшее распространение на растениях изученной выборки клубнеобразующих *Solanum* spp. имеет PVY – 58 % тестированных генотипов поражены этим вирусом. Поражение PVX обнаружено у 22 %, поражение PVM и PVS – у 36–37 % генотипов (см. табл. 1). Обнаружены статистически значимые различия двух групп *Solanum* spp. по пораженности мозаичными вирусами: доля пораженных PVY достоверно больше среди исследованных генотипов южноамериканских видов, тогда как PVX чаще детектирован у генотипов видов картофеля, относящихся к североамериканской группе. Нуль-гипотезу отвергаем на основании критерия χ^2 Пирсона с поправкой Йетса, значение которого при сопоставлении двух групп *Solanum* spp. по частоте поражения PVY $\chi^2 = 4.56$ ($p = 0.03$), по частоте поражения PVX $\chi^2 = 8.81$ ($p = 0.003$), критическое значение критерия $\chi^2 = 3.841$ (при уровне значимости $p = 0.05$ и числе степеней свободы 1).

Более половины генотипов изученной выборки клубнеобразующих *Solanum* spp. поражено двумя и более мозаичными вирусами. Смешанная инфекция всех четырех мозаичных вирусов обнаружена у растений девяти

Таблица 2. Поражение растений клубненосных *Solanum* spp. мозаичными вирусами картофеля (Санкт-Петербург, Пушкин, 2016–2017 гг.)

Серия (число видов)	Кол-во проверенных генотипов	Кол-во генотипов с положительной реакцией ELISA на мозаичные вирусы			
		PVY	PVX	PVS	PVM
Североамериканская группа					
Demissa (1)	2	2	0	2	0
Longipedicellata (5)	40	23	17	19	21
Pinnatisecta (2)	11	2	2	1	5
Cardiophylla (2)	8	2	2	1	1
Итого	61	29 ^a	21 ^b	23	27
Южноамериканская группа					
Yungasensia (1)	2	2	0	1	0
Glabrescentia (1)	10	5	1	8	5
Acaulia (1)	2	1	0	0	0
Bukasoviana (12)	46	30	4	9	6
Tarijensia (3)	4	3	0	2	2
Simpliciora (2)	10	8	4	6	9
Maglia (1)	2	2	0	2	1
Итого	76	51 ^a	9 ^b	28	23
Всего генотипов (%)	137 (100)	80 (58)	30 (22)	51 (37)	50 (36)

Примечание. Буквами отмечены значимые различия (по критерию χ^2 Пирсона).

генотипов, относящихся к видам *S. alandiae*, *S. fendleri*, *S. microdontum*, *S. papita*, *S. polytrichon*, *S. simplicifolium* и *S. stoloniferum*. Комплекс из трех вирусов выявлен у 15 генотипов, относящихся к видам *S. chacoense*, *S. kurtzianum*, *S. microdontum*, *S. molinae*, *S. pinnatisectum*, *S. polytrichon*, *S. simplicifolium* и *S. stoloniferum*.

Диагностика штаммов PVY. Растения 40 генотипов, представляющие виды *S. alandiae*, *S. avilesii*, *S. cardiophyllum*, *S. chacoense*, *S. ehrenbergii*, *S. fendleri*, *S. hjertingii*, *S. iopetalum*, *S. jamesii*, *S. kurtzianum*, *S. leptophyes*, *S. neocardenasii*, *S. pinnatisectum*, *S. polytrichon*, *S. simplicifolium*, *S. spgazzinii*, *S. stoloniferum*, дополнительно тестировали на наличие PVY методом ОТ-ПЦР (Sun et al., 2009). Вирус PVY не обнаружен у растений *S. leptophyes* (к-5764) и *S. neocardenasii* (к-24612), что согласуется с результатами ELISA. Штаммы PVY идентифицировали по наличию диагностических продуктов амплификации разного размера, полученных в результате мультиплексной ОТ-ПЦР (Chikh Ali et al., 2010). На рис. 1 представлены выборочные результаты идентификации штаммов PVY.

Нужно отметить, что результаты мультиплексной ОТ-ПЦР не всегда позволяют однозначно идентифицировать штаммы PVY. Например, «лишний» продукт амплификации размером 278 п. н. на дор. 3 и 4 (см. рис. 1); на дор. 6 кроме диагностируемых штаммов NA-PVY^N (1307 п. н.) и PVY^O (853 и 532 п. н.), четко проявляются фрагменты 1076, 633 и 278 п. н., но для идентификации других рекомбинантных штаммов не достает фрагмента 441 п. н.

Всего выявлено 27 генотипов, пораженных обычным штаммом PVY^O, по одному генотипу, пораженному рекомбинантными штаммами PVY^{NW} (A) и PVY^{NW} (B), семь генотипов, пораженных смесью штаммов PVY^O+PVY^{NW} (A) и один – смесью штаммов PVY^O, +PVY^{NTN-NW} (SYRI)

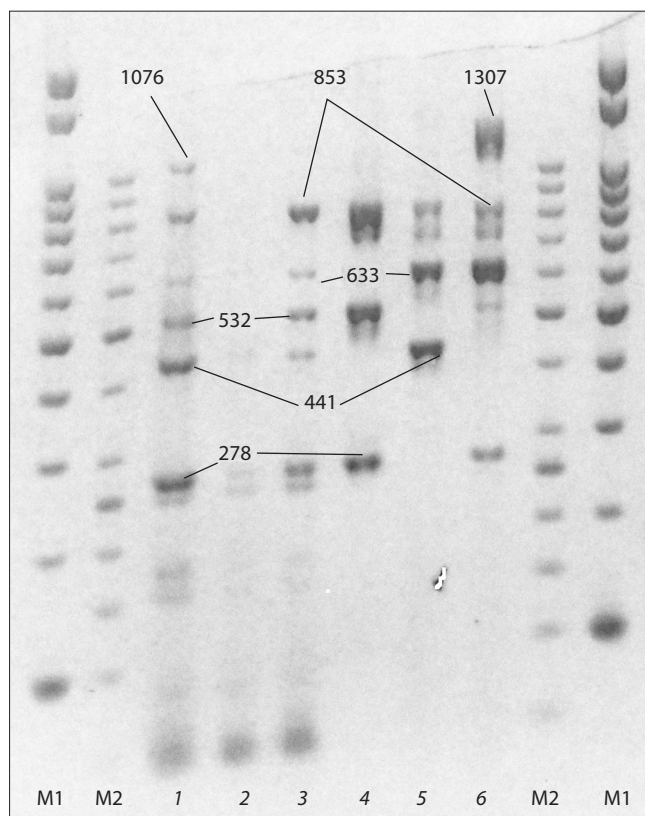


Рис. 1. Идентификация штаммов вируса PVY в образцах диких *Solanum* spp. методом мультиплексной ОТ-ПЦР.

Маркеры молекулярных весов: M1 и M2 – GeneRuler™ 1 кб и 50 п. н. DNA Ladder (Fermentas, Литва) соответственно. Образцы диких *Solanum* spp.: 1 – *S. cardiophyllum*; 2 – *S. jamesii*; 3 – *S. polytrichon*; 4 – *S. avilesii*; 5 – *S. iopetalum*; 6 – *S. jamesii*. Цифрами указаны размеры диагностических продуктов амплификации в п. н. Идентификация штаммов PVY представлена в табл. 3.

Таблица 3. Идентификация штаммов PVY в образцах *Solanum* spp. по наличию продуктов амплификации мультиплексной ОТ-ПЦР (Chikh Ali et al., 2010) (по рис. 1)

№	Вид	К-ВИР	Размер, п.н.	Штамм PVY
1	<i>S. cardiophyllum</i>	24375	1076, 853, 633, 532, 441, 278	PVY ^O , PVY ^{NTN-NW} (SYRI) и SYRIII
2	<i>S. jamesii</i>	24920	Не определено	Не определен
3	<i>S. polytrichon</i>	24410	853, 633, 532, 441, 278	PVY ^O и PVY ^{NW} (A)
4	<i>S. avilesii</i>	20884	853, 532, 278	PVY ^O
5	<i>S. iopetalum</i>	24393	853, 633, 441	PVY ^{NW} (A)
6	<i>S. jamesii</i>	24920	1307, 1076, 853, 633, 532, 278	PVY ^O и NA-PVY ^N



Рис. 2. Симптомы поражения *N. tabacum* L., сорт Самсун после инокуляции соком растений *Solanum* spp.

Растение сверху с симптомами некротизации жилок листа (некротический штамм PVY^N); растение внизу с симптомами посветления жилок (обычный штамм PVY^O).

и SYRIII. Результаты диагностики PVY иммунологическим и молекулярным методами совпали в 68 % случаев. Расхождение наблюдалось по результатам диагностики 13 генотипов, относящихся к *S. cardiophyllum*, *S. fendleri*, *S. hjertingii*, *S. kurtzianum*, *S. polytrichon*, *S. stoloniferum* и *S. pinnatisectum*, с отрицательной реакцией ELISA, но положительным результатом по данным ОТ-ПЦР.

Индикаторный тест. Для верификации результатов иммунологического и молекулярного анализов 21 генотип *Solanum* spp. проверили на зараженность PVY в биологи-

ческом тесте с помощью растений индикаторов *N. tabacum* L., сорта Самсун. На растениях *N. tabacum* L. после инокуляции соком растений 13 генотипов *Solanum* spp., у которых был обнаружен PVY, на седьмой день отмечены симптомы поражения. У одной группы растений табака наблюдали белое окаймление жилок, затем мозаику, симптомы которой сохранялись и через месяц, появляясь постепенно на новых листьях по мере их роста и развития (рис. 2, растение внизу). Такие симптомы свидетельствуют о поражении табака обычным штаммом вируса PVY^O. На других растениях *N. tabacum* наблюдали некрозы жилок, морщинистость листовой ткани с последующей некротизацией листа и замедлением роста растения (см. рис. 2, растение сверху). Такие симптомы свидетельствуют о поражении табака некротическим штаммом PVY^N. Видимые симптомы вирусной инфекции на растениях *N. tabacum* L. отчетливо различались в зависимости от генотипов *Solanum* spp., использованных в качестве источников вирусного инокулома. В соответствии с местной и системной реакцией, наблюдаемой на листьях растений индикаторов после инокуляции соком соответствующего растения дикого картофеля, мы идентифицировали поражение восьми генотипов *Solanum* spp. обычным штаммом и пяти генотипов – *Solanum* spp. некротическим штаммом Y-вируса (табл. 4).

Не обнаружено симптомов вирусного поражения на растениях табака после их инокуляции соком растений *S. leptophyes* и *S. neocardenasii*, которые, по данным ELISA и мультиплексной ОТ-ПЦР, свободны от PVY. Результаты детекции PVY иммунологическим и биологическим методом совпали при анализе 19 (90 % тестированных) генотипов *Solanum* spp. Инокуляция соком растений пяти генотипов: *S. fendleri*, *S. hjertingii*, *S. pinnatisectum* (двух генотипов), *S. cardiophyllum* (инфицированных PVY, по данным мультиплексной ОТ-ПЦР) и *S. simplicifolium* (с положительной реакцией ELISA и ОТ-ПЦР) не вызвала видимого эффекта на растениях *N. tabacum*. Совпадение результатов индикаторного теста и ОТ-ПЦР по диагностике Y-вируса установлено для 15 (71 % тестированных) генотипов, диагностики штаммового состава Y-вируса – для 9 (62 % тестированных) генотипов *Solanum* spp.

Растения *N. tabacum*, сорт Самсун, инокулированные соком *Solanum* spp., протестировали на наличие PVY методом ОТ-ПЦР. Анализ 12 фенотипически различных растений табака подтвердил наличие вируса в 10 тестируемых пробах (см. табл. 4). Результаты определения

Таблица 4. Диагностика PVY у растений *Solanum* spp. и *N. tabacum* L. комплексом методов

Вид	К-ВИР	Тестирование растений <i>Solanum</i> spp.			Тестирование <i>N. tabacum</i> методом ОТ-ПЦР
		ELISA	ОТ-ПЦР	<i>N. tabacum</i> (симптомы)	
<i>S. alandiae</i>	21240	PVY	PVY ^o	Мозаика	–
<i>S. avilesii</i>	20158	PVY	PVY ^o	»	PVY ^o
<i>S. avilesii</i>	20884	PVY	PVY ^o	»	PVY ^o
<i>S. cardiophyllum</i>	24375	Н.о.	PVY ^o , PVY ^{NTN-NW} (SYRI) и SYRIII	Отсутствуют	PVY ^o , PVY ^{NTN-NW}
<i>S. chacoense</i>	21321	PVY	PVY ^o	Некроз жилок	PVY ^o
<i>S. chacoense</i>	22687	PVY	PVY ^o	»	–
<i>S. fendleri</i>	5751	Н.о.	PVY ^o	Отсутствуют	–
<i>S. hjertingii</i>	15194	Н.о.	PVY ^o , PVY ^{NW(A)}	»	–
<i>S. iopetalum</i>	24393	PVY	PVY ^o , PVY ^{NW(A)}	Мозаика	PVY ^{NW(A)}
<i>S. jamesii</i>	24920 (221)	PVY	PVY ^o	Некроз жилок	PVY ^o , PVY ^N
<i>S. jamesii</i>	24920 (223)	PVY ?	PVY ^o , PVY ^{NW(A)}	Мозаика	Н.о.
<i>S. kurtzianum</i>	20038	PVY	PVY ^o	Некроз жилок	PVY ^o
<i>S. leptophyes</i>	5764	Н.о.	Н.о.	Отсутствуют	–
<i>S. neocardenasii</i>	24612	Н.о.	Н.о.	»	–
<i>S. pinnatisectum</i>	21955 (387)	Н.о.	PVY ^o ?	»	–
<i>S. pinnatisectum</i>	21955 (401)	Н.о.	PVY ^o , PVY ^{NW(A)}	»	–
<i>S. polytrichon</i>	18142	PVY	PVY ^o	Мозаика	PVY ^o
<i>S. polytrichon</i>	24410	Н.о.	PVY ^o , PVY ^{NW(A)}	»	PVY ^o , PVY ^{NW(A)}
<i>S. polytrichon</i>	24462	PVY	PVY ^o	»	PVY ^o
<i>S. simplicifolium</i>	12658	PVY	PVY ^o	Отсутствуют	Н.о.
<i>S. spgazzinii</i>	11431	PVY	PVY ^o	Некроз жилок	–

Примечание. PVY ? – реакция слабая; Н.о. – PVY не обнаружен; «–» – ПЦР не проводилась.

штаммового состава по симптомам и методом ОТ-ПЦР индикаторных растений совпали (или частично совпали) для семи генотипов: *S. avilesii* (к-20884 и к-20158), *S. iopetalum* (к-24393), *S. jamesii* (к-24920) (221), *S. polytrichon* (к-18142, к-24410 и к-24462). Для генотипов *S. chacoense* к-21321 и *S. kurtzianum* к-20038 некротический штамм Y-вируса, идентифицированный по реакции индикаторного растения, не соответствовал результатам ОТ-ПЦР. Для *S. cardiophyllum* к-24375, инфицированного смесью штаммов Y-вируса, результаты индикаторного теста не подтверждают данные ОТ-ПЦР.

Обсуждение

Сохранение, изучение и воспроизводство диких родичей картофеля – клубненосных *Solanum* spp. – осуществляются в полевом генном банке ВИР, расположенном на территории Научно-производственной базы Пушкинских и Павловских лабораторий ВИР (г. Пушкин). В течение длительного (более 40 лет) периода на опытных полях полевого генного банка ВИР занимаются воспроизводством и изучением коллекции сортов, селекционных клонов и видов секции Petota рода *Solanum* L., получением семенной репродукции растений клубненосных культурных и диких *Solanum* spp. Характерная особенность сформировавшегося агроценоза – генетическое разнообразие культурных

форм и дикорастущих родичей картофеля на локальном участке, благоприятное для проявления болезней и развития вредителей. Вероятно, популяции фитопатогенов, поражающих коллекционные посадки картофеля, высоко полиморфны, что обеспечивает выживаемость паразитов во взаимодействии с популяцией растения-хозяина. Это предположение подтверждают результаты сравнительного анализа изолятов *Phytophthora infestans* (возбудителя фитофтороза), собранных на листьях коллекционных образцов в полевом генном банке ВИР и коммерческих посадках сортового картофеля в Ленинградской области (Кузнецова и др., 2016; Sokolova et al., 2017).

Нами обнаружено разнообразие изолятов Y-вируса, в том числе рекомбинантного типа, на растениях разных *Solanum* spp. Впервые изоляты PVY^{NW(A)}, PVY^{NTN-NW} (SYRI) и SYRIII выявлены на растениях-сородичах картофеля на территории Северо-Западного региона Российской Федерации. Ранее в семенном картофеле из центральных регионов России и Беларуси были отмечены изоляты, относящиеся к рекомбинантным штаммам PVY^{NTN} и PVY^{N:O} (Усков и др., 2016).

При тестировании некоторых растений *Solanum* spp. (генотипы *S. cardiophyllum*, *S. chacoense*, *S. hjertingii*, *S. fendleri*, *S. kurtzianum*, *S. pinnatisectum*, *S. simplicifolium* и *S. spgazzinii*) на PVY комплексом методов (иммуно-

логический, молекулярный и биологический) получены противоречивые результаты.

Мультиплексная ПЦР для идентификации 10 штаммов PVY, включая редкие рекомбинантные, была разработана с учетом возможности выявления смешанных инфекций (Chikh Ali et al., 2010). Однако авторы отмечали невозможность в некоторых случаях смешанной инфекции идентифицировать генотип каждого штамма. В нашем эксперименте мы также столкнулись с примерами несоответствия в полной мере полученных нами продуктов амплификации с диагностическими фрагментами, указанными в (Chikh Ali et al., 2010) для точной диагностики всех генотипов штаммов PVY. Очевидно, что в мультиплексной ПЦР для смешанных инфекций важную роль может играть количественное соотношение разных генотипов штаммов вируса на пораженном растении, что может приводить к «нехватке» или наоборот к «избытку» некоторых диагностических продуктов амплификации для точной диагностики штаммов. В биологическом смысле можно предположить, что штаммы разного генотипа различаются по конкурентоспособности на разных видах растений-хозяев. Последнее обстоятельство может объяснить несоответствие диагностики штаммов вируса на картофеле и табаке после его инокуляции.

Противоречивые результаты детекции штаммов Y-вируса на растениях *Solanum* spp. и *N. tabacum* L. могут быть обусловлены генетическими отличиями диких родичей от сортового картофеля (*Solanum tuberosum* L.), на котором разрабатываются и апробируются методы диагностики. При современной классификации штаммов PVY, поражающих картофель, в первую очередь учитывают реакцию сортов с генами сверхчувствительности к определенным штаммам вируса и молекулярную характеристику изолята вируса, тогда как появление некрозов на растениях *N. tabacum* рассматривают как второстепенный признак (Karasev, Gray, 2013). Вероятно, при взаимодействии с растением-хозяином с другой генетической основой – дикими родичами картофеля, представителями других видов *Solanum*, происходят изменения биологических или иммунологических свойств отдельных изолятов Y-вируса. Нарушенная структура белка оболочки вируса у рекомбинантных штаммов, например, препятствует прохождению теста ELISA.

Разнообразие штаммов PVY, в особенности рекомбинантных, активно исследуется с помощью иммунологических и молекулярно-генетических методов, тогда как биологические свойства изучены лишь у ограниченного числа изолятов (Karasev, Gray, 2013; Green et al., 2017). PVY рассматривают как интересную модель для изучения эволюции вируса, который находится под действием отбора во взаимодействии с генетически различающимися растениями-хозяевами и в разных условиях среды. Эволюционируя за счет мутаций и рекомбинаций между разными штаммами, PVY способен преодолевать устойчивость сортов картофеля с N-генами. Установлено, что распространявшиеся на картофеле с недавнего времени штаммы PVY^{N-W} или PVY^{N:O} возникли в результате рекомбинации изолятов, относящихся к обычному PVY^O и некротическому PVY^N штаммам. Обнаружено более 30 вариантов рекомбинантных штаммов, появление ко-

торых объясняют рекомбинацией между изолятами разных подгрупп штаммов, в том числе между ранее возникшими рекомбинантами изолятами (Green et al., 2018). Изоляты PVY с нетипичными признаками, обнаруженные нами на растениях *S. cardiophyllum*, *S. chacoense*, *S. kurtzianum*, представляют особый интерес для дальнейших исследований.

Заключение

В коллекции полевого генного банка ВИР на растениях клубненосных видов рода *Solanum* L. не выявлен PSTVd, обнаружено широкое распространение мозаичных вирусов картофеля. Большая часть клонов диких родичей картофеля – *Solanum* spp., отобранных по устойчивости к фитофторозу и золотистой нематод, восприимчивы к PVX, PVS, PVM и PVY.

В изученной выборке растений клубненосных *Solanum* spp., пораженных PVY, преобладает обычный PVY^O штамм, второй по частоте распространения – рекомбинантный штамм PVY^{NW(A)}. На растениях *Solanum* spp. обнаружены изоляты PVY с разными биологическими и иммунологическими свойствами.

Список литературы / References

- Букасов С.М. Принципы систематики картофеля. Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1978;62(1):3-35.
[Bukasov S.M. Principles of potato taxonomy. Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 1978;62(1):3-35. (in Russian)]
- Горбатенко Л.Е. Южноамериканские виды картофеля (секция *Petota* Dumort. рода *Solanum* L.). Каталог мировой коллекции ВИР. Вып. 569. Л., 1990.
[Gorbatenko L. South-American potato species (*Petota* Dumort. section, *Solanum* L. genus). Catalog of the VIR Global Collection, No 569. Leningrad, 1990. (in Russian)]
- Кузнецова М.А., Козловский Б.Е., Бекетова М.П., Соколова Е.А., Малюченко О.П., Алексеев Я.И., Рогозина Е.В., Хавкин Э.Е. Фитопатологическая и молекулярная характеристика изолятов *Phytophthora infestans*, собранных с устойчивых и восприимчивых генотипов картофеля. Микол. и фитопатол. 2016;50(3): 175-184.
[Kuznetsova M.A., Kozlovsky B.E., Beketova M.P., Sokolova E.A., Malychenko O.P., Alekseev Ya.I., Rogozina E.V., Khavkin E.E. Phytopathological and molecular characteristics of *Phytophthora infestans* isolates collected on resistant and susceptible potato genotypes. Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology. 2016;50(3):175-184. <https://elibrary.ru/item.asp?id=26040085>. (in Russian)]
- Рогозина Е.В., Хавкин Э.Е., Кузнецова М.А., Гавриленко Т.А., Чалая Н.А., Бекетова М.П., Соколова Е.А., Антонова О.Ю., Фадина О.А., Сметанина Т.И. Каталог мировой коллекции ВИР. Вып. 816. Клоновая коллекция диких видов картофеля. СПб., 2015.
[Rogozina E.V., Khavkin E.E., Kuznetsova M.A., Gavrilenko T.A., Chalaya N.A., Beketova M.P., Sokolova E.A., Antonova O.Yu., Fadina O.A., Smetanina T.I. Catalog of the VIR World Collection, No. 816. Clonal Collection of Wild Potato Species. St. Petersburg, 2015. (in Russian)]
- Усков А.И., Варицев Ю.А., Бирюкова В.А., Галушка П.А., Варицева Г.П., Шмыгля И.В., Кравченко. Изучение штаммового состава Y-вируса картофеля из различных регионов Российской Федерации и Беларуси. Земледелие. 2016;8:36-38.
[Uskov A.I., Varitsev Yu.A., Biryukova V.A., Galushka P.A., Varitseva G.P., Shmyglya I.V., Kravchenko D.V. Study of the strain composition of potato Y virus from different regions of the Russian

- Federation and Belarus. *Zemledelie = Agriculture*. 2016;8:36-38. (in Russian)]
- Chikh Ali M., Maokac T., Natsuakid K.T., Natsuaki T. The simultaneous differentiation of Potato virus Y strains including the newly described strain PVYNTN-NW by multiplex PCR assay. *J. Virol. Methods*. 2010;165:15-20. DOI 10.1016/j.jviromet.2009.12.010.
- Clark M., Adams A. Characteristics of the microplate methods of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 1977;34(3):475-483. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/323416>.
- Green K., Brown C., Gray S., Karasev A. Phylogenetic study of recombinant strains of potato virus Y. *Virology*. 2017;507:40-52. DOI 10.1016/j.virol.2017.03.018.
- Green K., Brown C., Karasev A. Genetic diversity of potato virus Y (PVY): sequence analyses reveal ten novel PVY recombinant structures. *Arch. Virol.* 2018;163:23-32. DOI 10.1007/s00705-017-3568-x.
- Jeffries C. FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. Potato. Rome: IPGRI, 1998;19.
- Karasev A., Gray S. Continuous and emerging challenges of *Potato virus Y* in potato. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2013;51:571-586. DOI 10.1146/annurev-phyto-082712-102332.
- Lorenzen J.H., Piche L.M., Gudmestad N.C., Meacham T., Shiel P. A multiplex PCR assay to characterize *Potato virus Y* isolates and identify strain mixtures. *Plant Dis.* 2006;90:935-940. DOI 10.1094/PD-90-0935.
- Machida-Hirano R. Diversity of potato genetic resources. *Breed. Sci.* 2015;65(1):26-40. DOI 10.1270/jsbbs.65.26.
- Potato Biology and Biotechnology Advances and Perspectives. Eds. D. Vreugdenhil, J. Bradshaw, C. Gebhardt, F. Govers, M. Taylor, D. MacKerron, H. Ross. Amsterdam: Elsevier, 2007.
- Sokolova E.A., Kuznetsova M.A., Ulanova T.I., Rogozhin A.N., Smetanin A.T.I., Demidova V.N., Beketova M.P., Malyuchenko O.P., Alekseev Ya.I., Rogozina E.V., Khavkin E.E. Pathogenicity of East European strains of *Phytophthora infestans* vs. resistance of colonized potato plants: the profiles of *AVR* genes vs. *R* gene pyramids. PPO-Special Report. 2017;18:259-268. <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/448972#page=261>.
- Sun Q., Zhang C.Q., Meng Z.D., Zhang F.J., Mu C.H., Li W.C., Zhang Q.W. Establishment on the methods of detecting potato virus X and Y by complex RT-PCR. *J. Agr. Biotech.* 2009;17:737-738.
- Vincent H., Wiersema J., Kell S., Fielder H., Dobbie S., Castañeda-Álvarez N.P., Guarino L., Eastwood R., Leo B., Maxted N. A prioritized crop wild relative inventory to help underpin global food security. *Biol. Conserv.* 2013;167:265-275. DOI 10.1016/j.biocon.2013.08.011.
- Yanagisawa H., Shiki Y., Matsushita Y., Oishi M., Takaue N., Tsuda S. Development of a comprehensive detection and identification molecular based system for eight potyviroids. *Eur. J. Plant Pathol.* 2017;149(1):11-23. DOI 10.1007/s10658-017-1157-1.

ORCID ID

E.V. Rogozina 0000-0002-2743-068X

Благодарности. Работа по диагностике растений клубненоносных *Solanum* spp. на наличие мозаичных вирусов PVX, PVS, PVM и PVY методами ELISA и растений-индикаторов выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ВИР № 0662-2019-0004; молекулярная идентификация PSTVd и штаммов PVY выполнена в рамках КПНИ «Развитие селекции и семеноводства картофеля» в ВИЗР. Авторы благодарны И.В. Шмыгле, ведущему научному сотруднику лаборатории биоинженерии ВНИИКХ им. А.Г. Лорха, за предоставленные *in vitro* растения картофеля сорта Осень, инфицированные PSTVd и использованные как положительный контроль.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.11.2018. После доработки 03.01.2019. Принята к публикации 14.01.2019.