

DOI 10.18699/vjgb-24-61

Распространенность и видовой состав вирусов картофеля в Новосибирской области

В.С. Масленникова^{1,2}, М.Б. Пыхтина¹ ✉, К.А. Табанюхов^{1,2}, Е.В. Шелихова^{1,2}, К.И. Мосалев¹, А.В. Катохин¹,
А.А. Бондарь³, А.Б. Беклемишев¹, М.И. Воевода¹ 

¹ Федеральное исследовательское учреждение фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ pykhtina_maria@mail.ru

Аннотация. Среди множества болезней, поражающих растения картофеля, именно вирусные инфекции являются наиболее распространенными и наносят значительный ущерб хозяйствам, влияя как на урожайность, так и на качество картофеля. В связи с этим важное условие сохранения семенного фонда картофеля в России – систематический мониторинг и раннее высокоспецифичное обнаружение вирусных инфекций картофеля. Целью работы было исследование образцов сортов картофеля, собранных на территории Новосибирской области (НСО), на наличие вирусных инфекций методом ОТ-ПЦР. Изучено 130 растений картофеля из четырех районов Новосибирской области. В результате мониторинга обнаружены следующие вирусы: PVY (potato virus Y), PVS (potato virus S), PVM (potato virus M) и PVX (potato virus X). Ни в одном из анализируемых образцов не найден карантинный объект – вириод веретеновидности клубней картофеля (potato spindle tuber viroid – PSTVd). Максимальная частота встречаемости в районах области была отмечена для трех вирусов – PVY, PVM и PVS. Смешанные вирусные инфекции составили заметную долю образцов: встречаемость комбинации инфекции PVY + PVM в растениях составляла 25.0 %, PVY + PVS – 22.6 %. Для отработки методов выяснения штаммовой принадлежности изучаемых образцов проведено секвенирование нуклеотидных последовательностей капсидных белков 10 изолятов Y-вируса. С просеквенированными последовательностями был осуществлен филогенетический анализ совместно с набором последовательностей референсных штаммов 261-4, Eu-N, N:O, NE-11, NTNa, NTNb, N-Wi, O, O5, SYR_I, SYR_II, SYR_III, взятых в GenBank. В результате филогенетического анализа установлено, что образцы из НСО распределились в две группы штаммов: группа 1, включающая также изоляты референсных штаммов 261-4/SYR_III, и группа 2 – NTNa. Полученные результаты штаммовой принадлежности образцов из НСО закладывают основу для разработки ДНК- и иммунодиагностических систем для выявления PVY, циркулирующих в НСО, а также для выяснения источника и путей проникновения конкретных штаммов вируса.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*; вирусные инфекции; ОТ-ПЦР; Y-вирус картофеля; филогенетический анализ.

Для цитирования: Масленникова В.С., Пыхтина М.Б., Табанюхов К.А., Шелихова Е.В., Мосалев К.И., Катохин А.В., Бондарь А.А., Беклемишев А.Б., Воевода М.И. Распространенность и видовой состав вирусов картофеля в Новосибирской области. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(5):554-562. DOI 10.18699/vjgb-24-61

Финансирование. Работа выполнена в рамках темы НИР: № 1022072600029-5-1.6.2;1.6.8 и бюджетного проекта № 122032200236-1 с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

Distribution and species composition of potato viruses in the Novosibirsk region

V.S. Maslennikova^{1,2}, M.B. Pykhtina¹ ✉, K.A. Tabanyukhov^{1,2}, E.V. Shelikhova^{1,2}, K.I. Mosalev¹, A.V. Katokhin¹,
A.A. Bondar³, A.B. Beklemishev¹, M.I. Voevoda¹ 

¹ Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

✉ pykhtina_maria@mail.ru

Abstract. Among the many diseases that affect potato plants, viral infections are the most common and cause significant damage to farms, affecting both the yield and quality of potatoes. In this regard, an important condition for preserving the potato seed fund in Russia is systematic monitoring and early highly specific detection of potato viral infections. The purpose of the work is to study samples of potato varieties collected in the Novosibirsk region for the presence of viral infections using RT-PCR. 130 potato plants from three districts of the Novosibirsk region (NR) were studied. As a result of monitoring, the following viruses were identified: PVY (potato virus Y), PVS (potato virus S), PVM (potato

virus M) and PVX (potato virus X). The quarantine pathogen potato spindle tuber viroid (PSTVd) was not detected in any of the samples analyzed. The maximum frequency of occurrence in the region was noted for three viruses: PVY, PVM and PVS. A significant proportion of the samples were mixed viral infections: the occurrence of the combination of infection PVY + PVM in plants was 25.0 %, and PVY + PVS, 22.6 %. To develop methods for determining the strain affiliation of the studied samples, the nucleotide sequences of the capsid protein genes of 10 Y-virus isolates were sequenced. Phylogenetic analysis of the studied sequences of NR isolates was carried out with a set of sequences of reference strains 261-4, Eu-N, N:O, NE-11, NTNa, NTNb, N-Wi, O, O5, SYR_I, SYR_II and SYR_III retrieved from GenBank. As a result of phylogenetic analysis, it was established that NR viral samples fell into two groups of strains: group 1, which also includes isolates of the reference strains 261-4/SYR_III, and group 2, NTNa. The obtained results of the strain affiliation of NR samples lay the basis for the development of DNA and immunodiagnostic systems for identifying PVY circulating in NR, as well as for elucidating the source and routes of entry of specific virus strains.

Key words: *Solanum tuberosum*; viral infections; RT-PCR; potato Y virus; phylogenetic analysis.

For citation: Maslennikova V.S., Pykhtina M.B., Tabanyukhov K.A., Shelikhova E.V., Mosalev K.I., Katokhin A.V., Bondar A.A., Beklemishev A.B., Voevoda M.I. Distribution and species composition of potato viruses in the Novosibirsk region. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii*=*Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(5):554-562. DOI 10.18699/vjgb-24-61

Введение

Новосибирская область – благоприятный регион для возделывания картофеля (Батов, Гуреева, 2023). Площади его выращивания в промышленном секторе картофелеводства (данные по сельхозорганизациям и крестьянско-фермерским хозяйствам, без учета хозяйств населения) Новосибирской области в 2023 г. составляли 3.8 тыс. га, что на 6.2 % (на 0.2 тыс. га) больше, чем в 2022 г. При этом валовые сборы картофеля в промышленном секторе картофелеводства Новосибирской области составили 74.9 тыс. т, что на 12.9 % (на 8.5 тыс. т) больше, чем в 2022 г. В состав 10 первых районов по размеру убранной площади картофеля в Новосибирской области в 2023 г. вошли: Новосибирский (36.8 % от общей площади), Ордынский (25.6 %), Мошковский (18.6 %), Карасукский (5.2 %), Тогучинский (4.4 %), Черепановский (3.3 %), Сузунский (1.8 %), Искитимский (1.7 %), Коченёвский (1.3 %), Баганский (0.4 %). На долю остальных районов суммарно было 1.0 % (<https://ab-centre.ru/news/typok-kartofelya-novosibirskoy-oblasti---klyuchevye-tendencii>).

По данным федеральной службы государственной статистики, средняя урожайность картофеля в России составляет около 16 т/га (https://rosstat.gov.ru/enterprise_есопому), в Новосибирской области – 22.5 т/га (Батов, Гуреева, 2023), в то время как максимальная продуктивность этой культуры на отдельных сортах может достигать 400 т/га (Государственный реестр селекционных достижений..., <https://gossortrf.ru/>). Снижение урожайности во многом обусловлено влиянием различных внешних факторов, в том числе и распространённостью большого количества вирусных патогенов.

В настоящее время 40 фитопатогенных вирусов картофеля идентифицировано в различных странах и регионах (Hameed et al., 2014; Onditi et al., 2021). Наиболее важными из них, получившими повсеместное распространение везде, где возделывается картофель, являются вирус скручивания листьев картофеля (ВСЛК, potato leaf roll virus – PLRV), Y-вирус картофеля (YBK, potato virus Y – PVY), X-вирус картофеля (ХВК, potato virus X – PVX), S-вирус картофеля (SBK, potato virus S – PVS), M-вирус картофеля (МВК, potato virus M – PVM). Каждый из этих патогенов способен привести к потере от 10 до 60 % урожая, а при

смешанной вирусной инфекции потери могут быть еще выше (Byarugaba et al., 2020).

Вирус PVY занимает пятое место в десятке самых важных вирусов растений в мире (Scholthof et al., 2011) и приносит наибольший экономический ущерб при выращивании картофеля. Кроме того, этот вирус приводит к поражению других распространенных сельскохозяйственных культур, таких как томаты, перец, табак (Kerlan, Moury, 2008; Lacomme et al., 2017). Геном PVY обладает высокой степенью генетической изменчивости, а также подвержен рекомбинации. Вирус PVY существует в виде комплекса штаммов, которые можно определить на основе реакций гиперчувствительности к трем известным N-генам картофеля (Jones, 1990; Chikh-Ali et al., 2014) или на основе последовательностей генома и паттернов рекомбинации (Karasev, Gray, 2013; Green et al., 2017). В настоящее время идентифицировано 14 штаммов PVY (Karasev, Gray, 2013; Green et al., 2017), в том числе пять нерекомбинантных (PVYO, PVYEu-N, PVYNA-N, PVYC и PVYO-O5) и девять рекомбинантных штаммов (PVY-N:O, PVY-N-Wi, PVY-NTNa, PVY-NTNb, PVY-NE11, PVY-E, PVY-SYR-I, -II и -III) (Chikh-Ali et al., 2016a, b; Green et al., 2017). Также сообщается о 14 дополнительных рекомбинантах и вариантах генома (Green et al., 2018).

Поскольку заболевания, вызываемые вирусами картофеля, в полевых условиях неизлечимы, раннее обнаружение данных возбудителей и определение их видового состава – актуальная задача сельского хозяйства, входит в подпрограмму «Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации» федеральной научно-технической программы развития сельского хозяйства на 2017–2025 гг.

В настоящее время существует три основных метода диагностики вируса в клубнях картофеля: ОТ-ПЦР в реальном времени, иммуноферментный и иммунохроматографический анализы.

Ранее в некоторых регионах Российской Федерации были проведены исследования вирусной нагрузки на агроценозы картофеля. В 2016 г. в Астраханской области на всех посадках раннего репродукционного картофеля, за исключением сорта Крона, была зафиксирована высокая пораженность Y-вирусом, особенно на сортах Импала

(65–95 %), Ред Скарлетт (85 %) и Кураж (60 %). В 2017 г. на сорте Импала при сохранении высокой пораженности PVY (60 % растений) наблюдалось значительное поражение этого сорта (50 % растений) PVS и PVM (Фоминых и др., 2017). Частота встречаемости PVS и PVM по Республике Башкортостан составила 87 и 78 %, PVX – 12 %, PVY – 28 %; до 61.6 % клубней были инфицированы двумя вирусами (PVS+PVY, PVS+PVX и PVM+PVY) и 2.8 % образцов – сочетанием трех вирусов. Только 6.9 % изученных образцов не содержали вирусов (Хайруллин и др., 2021).

С учетом высокой зараженности вирусными инфекциями растений картофеля по различным областям России крайне важна ранняя и точная диагностика вирусных инфекций с исследованием генетического полиморфизма отдельных штаммов наиболее встречаемых видов вирусов. После внедрения методов ПЦР-диагностики стали поступать многочисленные данные о генетическом разнообразии штаммов PVY и появилась возможность проводить более детальные исследования, направленные на выяснение источников и путей распространения вирусов картофеля. Например, по результатам мониторинга с помощью метода ОТ-ПЦР встречаемости вирусов в образцах четырех сортов картофеля (Ред Скарлетт, Сильвана, Лабелла, Невский) было обнаружено, что 100 % растений заражены X-вирусом и 26.3 % – Y-вирусом (Григорян, Ткаченко, 2019), а зараженность картофеля Y-вирусом в Пермском крае в 2019 г. составила 100 % (Печенкина, Боронникова, 2020).

В исследованиях А.М. Малько с коллегами (2017) показана высокая встречаемость PVY в Самарской, Тверской и Ленинградской областях (33.3, 29.2 и 25.7 % соответственно), PVS – в Самарской и Иркутской областях (66.7 и 30.5 % соответственно), PVM – в Тверской, Самарской и Нижегородской областях (25.0, 22.2 и 19.4 % соответственно). Диагностика вирусных заболеваний картофеля методом ПЦР в реальном времени, проведенная в 2019 г. в Саратовской области, обнаружила PVY у двух сортов картофеля при отсутствии визуальных поражений растений.

Федеральным исследовательским центром картофеля им. А.Г. Лорха с 2015 г. проводится изучение серологи-

ческих и фитопатологических характеристик изолятов PVY из различных регионов Российской Федерации, в том числе Новосибирской области. Из семи идентифицированных изолятов с моноинфекцией PVY в материале из Новосибирской области пять изолятов проявляли серологические и фитопатологические свойства PVY^{O/C} (обыкновенный штамм и штамм акропетального некроза) (Uskov et al., 2022).

Целью настоящей работы стало изучение с помощью молекулярно-генетических методов видового состава вирусов картофеля разных сортов и категорий и пораженности ими растений в хозяйствах Новосибирской области для определения распространенности их в семенных клубнях, а также исследование штаммового состава отдельных изолятов PVY.

Материалы и методы

Работа была выполнена в 2023 г. Исследования проводились на 130 растениях картофеля *Solanum tuberosum* из Искитимского (сорта Гала (PC1), Ред Скарлетт (Э), Розара (PC1)), Ордынского (сорта Гала (PC1), Леди Клэр (PC1), Розара (PC1)), Коченёвского (сорта Златка (СЭ), Розара (PC1)) и Новосибирского (сорта Гала (PC1), Ред Скарлетт (PC1)) районов Новосибирской области (табл. 1).

Образцы поставляли хозяйства из указанных областей по договору с ФГБУ «Россельхозцентр» по Новосибирской области, они были отобраны в соответствии с ГОСТ 33996-2016. Анализировали 10 образцов. В образцах Искитимского района насчитывалось по 20 клубней, в образцах Ордынского, Коченёвского и Новосибирского районов – по 10 клубней. Клубни картофеля каждого сорта культивировали в пластиковых горшках (объемом 0.7 л) в боксах при температуре +24 °C ± 1 °C, фотопериоде 16/8 ч: свет/темнота. Пробы листьев для определения вирусной нагрузки отбирали на четвертую неделю после посадки с верхнего, среднего и нижнего ярусов растений. Среди исследованных сортов четыре, Розара, Леди Клэр, Гала, Ред Скарлетт, являются сортами зарубежной селекции, а один сорт (Златка) – отечественной селекции. Выделение вирусной РНК из собранных листьев картофеля проводили с использованием набора «ФитоСорб» производ-

Таблица 1. Анализируемый материал картофеля по районам Новосибирской области

Район	Сорт, срок созревания	Количество проанализированных клубней, шт.	Репродукция
Искитимский	Гала, среднеранний	20	PC1
	Ред Скарлетт, раннеспелый	20	Э
	Розара, раннеспелый	20	PC1
Новосибирский	Гала, среднеранний	10	PC1
	Ред Скарлетт, раннеспелый	10	PC1
Коченёвский	Златка, среднеспелый	10	СЭ
	Розара, раннеспелый	10	PC1
Ордынский	Гала, среднеранний	10	PC1
	Леди Клэр, раннеспелый	10	PC1
	Розара, раннеспелый	10	PC1

ства компании «СИНТОЛ» (Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Анализ РНК выполняли на амплификаторе Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия). Наличие вирусов в образцах листьев картофеля определяли с использованием набора реагентов (НПК «СИНТОЛ») PV-005: PVX, PVY, PVM, PLRV, PVA, PVS и PSTVd.

Подготовка образцов к секвенированию ДНК. Отдельные Y-позитивные изоляты (10 шт.) были отобраны для получения кДНК с целью последующего секвенирования области гена капсидного белка. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора реактивов ОТ M-MuLV-RH («Биолабмикс», Россия), согласно протоколу производителя: на реакцию брали 2–5 мкг суммарной РНК и вносили праймеры (473-F: 5'-CAAATGACACAATCGATGCA-3'; 474-R: 5'-CATGTTCTTGACTCCAAGTAGAGTATG-3'), предназначенные для синтеза первой и затем второй цепи кДНК на участке геномной РНК PVY, кодирующем капсидный белок вируса. Подбор праймеров выполняли на основе сравнения нуклеотидных последовательностей гена белка оболочки известных изолятов Y-вируса, представленных в GenBank.

Синтезированные ДНК использовали далее для амплификации методом ПЦР кодирующей области гена капсидного белка PVY исследуемых изолятов вируса. ПЦР осуществляли в реакционной смеси, содержащей названные выше праймеры 473-F и 474-R. Смесь нагревали в течение 5 мин при 70 °С и переносили в ледяную баню на 2 мин, затем вносили смесь остальных реагентов (РНК-зависимую ДНК-полимеразу, ОТ-буфер, дезоксинуклеотидтрифосфаты) инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре; затем переносили в термостат на 42 °С на 2 ч; по окончании реакцию останавливали прогреванием в течение 15 мин при 70 °С. Количественную ПЦР с детекцией в реальном времени проводили с использованием «БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue(2x)» компании «Биолабмикс». ПЦР выполняли в амплификаторе CFX96 Touch (2014, Bio-Rad Laboratories, США) в соответствии со следующей программой амплификации: денатурация ДНК при 95 °С – 1 мин, с последующими 40 циклами ПЦР (денатурация ДНК 95 °С – 20 с, отжиг праймеров при 55 °С – 15 с, элонгация цепи ДНК при 72 °С – 30 с). Продукты амплификации разделяли гель-электрофорезом в 0.8 % агарозном геле, содержащем 0.00005 % EtBr.

Секвенирование ампликонов гена капсидного белка изолятов PVY. Ампликоны размером ~800 н. п., кодирующие капсидный белок Y-вируса картофеля (PVY), очищали от компонентов ПЦР реакционной смеси сорбцией на магнитных частицах SpeedBead (GE Healthcare, США) в присутствии 7 % PEG-8000. После трехразовой промывки 80 % этанолом ампликоны элюировали MilliQ водой. Для реакции секвенирования по Сэнгеру использовали 0.5 пкмоль ампликона, 20 пкмоль одного из праймеров (473_F_coat-Y-vir или 474_R_coat-Y-vir), 2 мкл реагента BigDye v.3.1, 8 мкл 5X буфера для секвенирования (Ntagen, США), 8 мкл 5M бетаина и MilliQ воду до суммарного объема реакции в 40 мкл. Температурный профиль реакции Сэнгера состоял из: денатурации при 96 °С в течение 3 мин, а затем 70 циклов (плавления при 96 °С в течение 25 с; отжига при 40 °С в течение 10 с; элонгации

при 60 °С в течение 3 мин) с завершающим прогревом при 98 °С – 5 мин и хранением до очистки при 4 °С. Затем реакции Сэнгера очищали от непрореагировавшего BigDye с помощью гель-фильтрации в микролонках планшетного формата через полусухой столбик Sephadex G-50 (GE Healthcare, США) центрифугированием при 1700 g в течение 4 мин. Продукты реакции Сэнгера анализировали на автоматическом геномном анализаторе ABI 3500XL (Applied Biosystems, США) в ЦКП «Геномика» (ИХБФМ СО РАН). Нуклеотидные последовательности исследуемых ампликонов использовали для анализа с помощью выравнивания и сравнения с базой данных GenBank (NCBI, США).

Сравнение нуклеотидных последовательностей генов капсидного белка изолятов PVY. Для филогенетического анализа нуклеотидные последовательности гена капсидного белка изолятов PVY из Новосибирской области сравнивали с помощью сервиса MAFFT (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>) с соответствующими референсными последовательностями, представленными в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Анализ проводили в программе MEGAX (Kumar et al., 2018) с помощью алгоритма максимального правдоподобия (ML). Для филограммы на основе нуклеотидных последовательностей с применением всех позиций кодонов задействовали эволюционные модели замен, указанные модулем MEGAX>Models: TN92(G+I) (Tamura–Nei). Для филограммы на основе аминокислотных последовательностей – JTT(G+I) (Jones–Taylor–Thorton). В качестве референсных последовательностей использованы следующие: для кластера штаммов 261-4: KY848023, AM113988, JF927755; Eu-N: KY847988, KY847986, JQ969036; N:O: KY847974, KY848018, AY884985, Z70238, AJ584851; NE-11: JQ971975, HQ912867; NTNa: AJ890344, M95491_i, AJ890345, AY884982; NTNb: AJ890343; N-Wi: KY847961, AJ890350, JQ924286, JN034046, AJ890349, KY847996; O: HQ912865, FJ643479, EF026074, AJ585196, JX424837; O5: FJ643477, U09509, HM367076, HQ912909, KY848035; SYR_I: GQ200836; SYR_II: AJ889867; SYR_III: AB461454. Для определения устойчивости дендрограмм применяли метод бутстрепа (500 итераций).

Статистика. Встречаемость вирусов была оценена по критерию χ^2 с поправкой Йейтса.

Результаты

Максимальная частота встречаемости в районах Новосибирской области была отмечена для трех вирусов – PVY, PVM и PVS (табл. 2). Вирус PVY встречался во всех исследуемых районах и поражал все сорта картофеля, в отличие от M- и S-вирусов. Распределение вирусов по районам Новосибирской области было неравномерным (табл. 3).

Наиболее высокий уровень инфицирования PVY был установлен в Новосибирском районе, где его распространенность на сорте Гала достигала 100 %. На том же сорте был обнаружен вирус скручивания листьев картофеля (20 %). Вирус PVS встречался во всех районах области, однако наибольшее распространение (30–100 %) выявлено в Ордынском и Коченёвском районах. Вирус X картофеля встречался в Искитимском и Ордынских районах (40–50 %). Следует также отметить, что в связи с широ-

Таблица 2. Распространенность вирусов картофеля по районам области, %

Сорт	PVX	PVY	PVM	PLRV	PVA	PVS	PSTVd
Искитимский район							
Гала	50	30	75	–	–	55	–
Ред Скарлетт	–	90	80	–	–	–	–
Розара	–	70	–	–	–	90	–
Коченёвский район							
Златка	–	60	100	–	–	100	–
Розара	–	50	–	–	–	–	–
Новосибирский район							
Ред Скарлетт	–	60	–	–	–	30	–
Гала	–	100	100	20	–	80	–
Ордынский район							
Розара	40	60	40	–	20	100	–
Гала	–	20	–	–	–	20	–
Леди Клэр	–	60	–	–	–	–	–

Таблица 3. Случаи заражения вирусами картофеля в разных районах Новосибирской области

Район	Сорт	Всего растений, шт.	Зараженные растения, шт.							χ^2	p
			PVX	PVY	PSTVd	PVM	PLRV	PVS	PVA		
Искитимский	Ред Скарлетт	20	0	18	0	16	0	0	0	112.067	$7.52 \cdot 10^{-22}$
	Гала	20	10	6	0	15	0	11	0		
	Розара	20	0	14	0	0	0	18	0		
	Сумма по сортам		10	38	0	31	0	29	0		
Новосибирский	Ред Скарлетт	10	0	6	0	0	0	3	0	53.2	$1.07 \cdot 10^{-9}$
	Гала	10	0	10	0	10	2	8	0		
	Сумма по сортам		0	16	0	10	2	11	0		
Коченёвский	Розара	10	0	5	0	0	0	0	0	37.94	$1.16 \cdot 10^{-6}$
	Златка	10	0	6	0	10	0	10	0		
	Сумма по сортам		0	11	0	10	0	10	0		
Ордынский	Розара	10	4	6	0	4	0	10	2	38.2	$1.03 \cdot 10^{-6}$
	Гала	10	0	2	0	0	0	2	0		
	Леди Клэр	10	0	6	0	0	0	0	0		
	Сумма по сортам		4	14	0	4	0	12	2		

Примечание. Гипотеза о преобладании определенных вирусов картофеля в районах области проверена по критерию χ^2 с поправкой Йейтса. Значения p определены как $p = 0.000$.

ким возделыванием в нашей области сортов зарубежной селекции высокую распространенность получил вирус M (40–100 %). Среднеранние сорта (Гала, Златка) чаще, чем раннеспелые, были поражены PVM. Наибольшая вирусная нагрузка (PVX, PVY, PVM, PVA, PVS) была отмечена на сорте Розара Ордынского района. Вириод веретеновидности клубней картофеля (карантинный объект) отсутствовал у всех протестируемых образцов.

Смешанные вирусные инфекции составили заметную долю образцов: встречаемость комбинации инфекции в растениях: PVY+PVM – 25.0 %, PVY+PVS – 22.6 %,

PVY+PVX – 3.8 % (табл. 4). При этом распространенность «моноинфекции» какого-либо вируса (PVS, PVM, PVX, PVY) составила 19.4 %, а количество растений, в которых отсутствовали вирусы, – менее 1 %. У 15.37 % образцов были выявлены три вируса в сочетании PVS+PVM+PVY, а у 1.8 % – четыре вируса (PVS+PVM+PVX+PVY).

Для выяснения штаммовой принадлежности изучаемых образцов из НСО амплифицированные фрагменты генома PVY, соответствующие зрелому пептиду капсидного белка, были просеквенированы и проанализированы филогенетическими методами с привлечением ре-

Таблица 4. Частота встречаемости вирусов картофеля

Сочетания вирусов	Частота встречаемости, %
Без заражения	0.88
Монозаражение:	
PVS	6.85
PVM	1.25
PVY	11.25
PVX	0
Два вируса:	
PVS+PVM	6.25
PVS+PVY	22.60
PVM+PVY	25.00
PVS+PVX	3.75
PVX+PVY	3.75
Три вируса:	
PVS+PVM+PVY	15.37
PVS+PVY+PVA	1.25
Четыре вируса:	
PVS+PVM+PVX+PVY	1.80

ференсных последовательностей из GenBank, подробно охарактеризованных в статьях (Green et al., 2017, 2018). Регистрационные номера референсных последовательностей приведены в разделе «Материалы и методы». Полученные в программе MEGAX дендрограммы на основе нуклеотидных и аминокислотных последовательностей позволили визуализировать распределение использованных референсных штаммов.

Самую компактную группу образовали штаммы кластера O5, представляющие образцы из Северной Америки с одноименным серотипом O5. Этот кластер был использован как условная «внешняя группа» при построении дендрограмм для определения примерного направления эволюции генетического разнообразия PVY. Другие штаммовые кластеры сгруппировались не столь четко. Это можно объяснить тем, что при построении монолокусных дендрограмм (как в нашем случае) нет возможности отразить последствия рекомбинационных событий, которые, как известно, постоянно происходят в процессе адаптации вирусов для обеспечения преодоления защитных механизмов пораженных растений-хозяев и распространения на новые растения.

Как видно из рисунка, образцы из НСО распределились по двум группам штаммов: группа 1, включающая образцы NSO01-05 и NSO08-09, объединяется со штаммами кластеров 261-4 и SYR_III, а группа 2, включающая образцы NSO06-07 и NSO10, объединяется со штаммами кластера NTNa.

Сравнение топологий нуклеотидной и аминокислотной дендрограмм также дает ожидаемый вывод о том, что значительная часть нуклеотидного разнообразия вирусных последовательностей не проявляется на уровне кодируемых пептидов. Видно, что образцы НСО первой

группы на аминокислотном уровне идентичны друг другу и, вероятно, будут иметь одинаковые иммунохимические свойства в случае использования эпитопов зрелого капсидного белка в качестве серологического теста. То же можно сказать и об образцах второй группы. При этом можно ожидать, что при наличии общих эпитопов часть их все-таки будут настолько различаться между представителями двух исследуемых групп, что можно будет разработать дифференциальные серологические тесты.

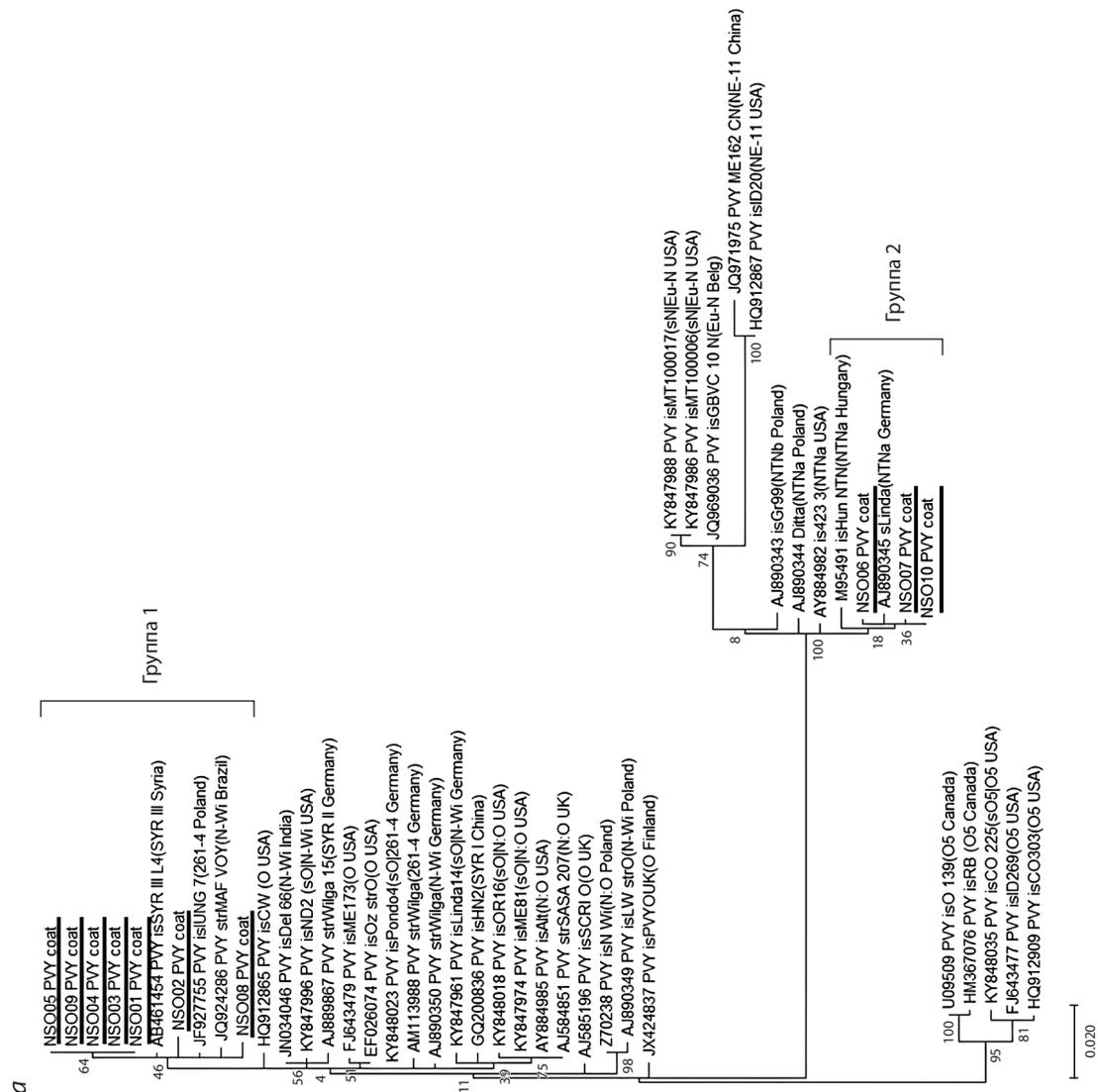
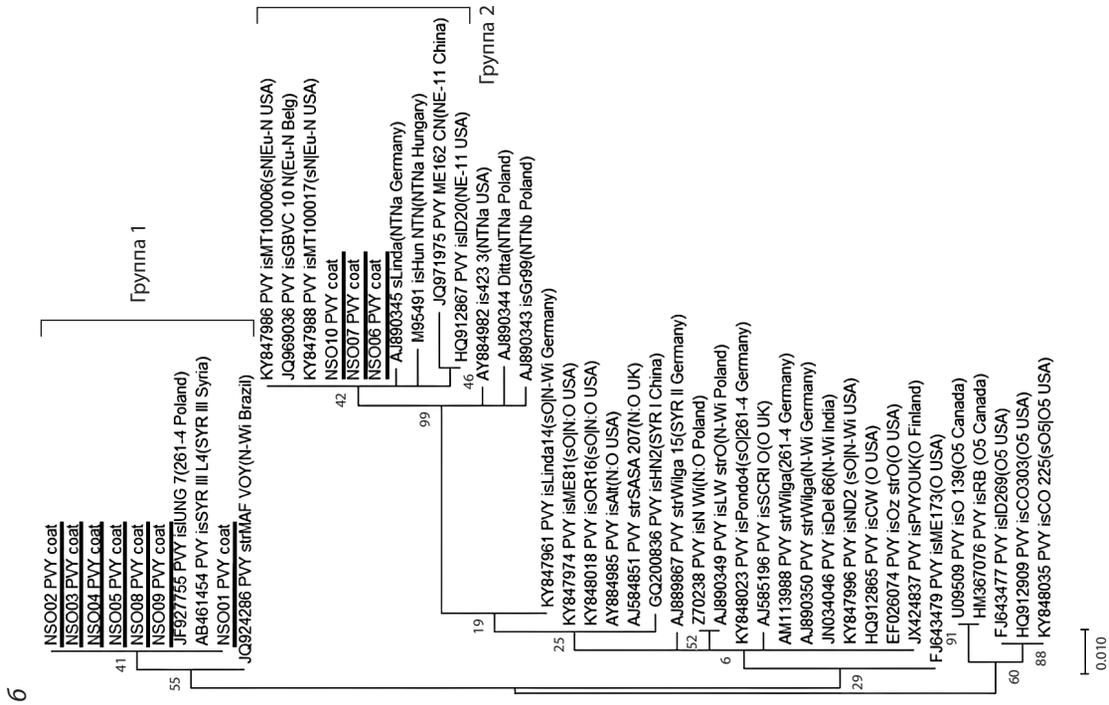
Обсуждение

Вирусные инфекции картофеля приводят к значительному снижению его урожайности, в связи с чем мониторинг зараженности семенного материала – необходимая мера для стабильного и устойчивого производства этой культуры.

В настоящей работе методом ОТ-ПЦР проведен мониторинг вирусных инфекций семенного картофеля по Новосибирской области, который выявил высокую вирусную нагрузку. Среди проанализированных образцов не обнаружено различий в распространении вирусов, связанных с сортовой устойчивостью и/или репродукцией. По результатам анализа распространенности вирусных инфекций было установлено, что чаще всего растения инфицированы вирусами PVY, PVS и PVM, которые встречаются практически повсеместно в исследуемых районах области с частотой 30–100 %. В отличие от большинства других вирусов картофеля, PVY расширяет свое географическое распространение и наносит экономический ущерб посадкам картофеля не только в России, но во всем мире (Buyarugaba et al., 2020; Kreuze et al., 2020). Смешанная вирусная инфекция, включающая PVY, встречается чаще всего (Kerlan, Moury, 2008), поскольку большинство сортов картофеля к нему не устойчиво (Ahmadvand et al., 2012).

Характерным для растений картофеля, возделываемого в Новосибирской области, является поражение двумя вирусами (61.35 % образцов), из которых чаще всего (25.0 %) встречались вирусы PVM+PVY. Наличие трех или четырех вирусов одновременно отмечено у 16.62 и 1.8 % образцов. Растения, пораженные вирусами, были низкорослые, листовые пластинки – недоразвиты. Наблюдалось быстрое и преждевременное разрастание пазушных почек. Отмечалась морщинистость и складчатость листьев, их глубокое жилкование, хлороз, краевой некроз. Этот результат подтверждает результаты других ученых (Хайруллин и др., 2021), в которых показано, что картофель может быть одновременно заражен более чем четырьмя вирусами, включая наиболее экономически важные вирусы. Широкому распространению вирусов на картофеле способствуют большая засоренность полей многолетними сорняками-резервуарами вирусной инфекции (Szabó et al., 2020), огромное видовое разнообразие и высокая численность переносчиков (Danci et al., 2009; Fox et al., 2017).

Поскольку вирусные заболевания картофеля неизлечимы, важное значение имеют профилактические мероприятия, направленные на использование устойчивых к вирусным инфекциям сортов и неинфицированного семенного материала. Эти профилактические меры требуют систематического раннего выявления вирусных инфек-



Филогенетический анализ изолятов PVY из НСО совместно с образцами, представленными в GenBank. Обозначения кластеров штаммов и страна выявления образца указаны в скобках. Для некоторых образцов указаны серологические классы, например «sO»; перед вертикальной чертой. Образцы из НСО подчёркнуты. а – ML-дендрограмма на основе нуклеотидных последовательностей; б – ML-дендрограмма на основе аминокислотных последовательностей.

ций, отсутствие которого привело к массовому заражению фитопатогенами картофеля в России, в том числе и посевного материала. Поэтому создание высокочувствительной, ранней и пригодной в полевых условиях диагностики вирусных инфекций картофеля – актуальная задача.

Вирус PVY считается одним из наиболее значимых вирусов, поражающих как картофель, так и другие экономически важные виды пасленовых (перец, томат, табак). Поскольку этим видом вируса, по результатам наших исследований, было инфицировано наибольшее количество образцов, представляло интерес определить нуклеотидные последовательности гена капсидного белка исследуемых изолятов PVY из НСО с целью выяснения уровня консервативности этих белков для последующего создания на их основе высокоспецифичной для сибирского региона иммунохроматографической тест-системы. Филогенетический анализ полученных образцов позволил выделить среди них две группы штаммов PVY: группу, включающую штаммы 261-4/SYR_III, и группу с NTNa. Вирус PVY получает все большее распространение по всему миру, преимущественно по причине роста заболеваемости рекомбинантными формами вируса, такими как PVYNWi и PVYNTN. Эти штаммы обладают высокой вирулентностью и малой выраженностью симптоматики, что затрудняет их выявление в семенном картофеле.

Наши результаты согласуются с данными других ученых, исследовавших штаммы изолятов Y-вируса на территории РФ. А.И. Усков с коллегами (2016) при исследовании штаммового состава Y-вируса картофеля, распространенного на территории РФ в 2015–2016 гг., на одном сортообразце идентифицировали ординарный штамм PVYO, в 19 – штамм кольцевого некроза клубней PVYNTN, в 36 – рекомбинантный штамм PVYN:O и в 53 сортообразцах – одновременно два штамма, PVYNTN и PVYN:O. А.А. Стахеев с коллегами (2023) на основании сравнительного анализа маркерной последовательности локуса 5'-нетранслируемой области NTR определили, что изоляты Y-вируса картофеля, распространенные на различных территориях РФ, относились преимущественно к некротической и рекомбинантной группам штаммов, за исключением отдельного изолята, занимающего промежуточное положение между этими двумя группами.

Определение штаммовой принадлежности PVY имеет не только важное значение в плане совершенствования стратегий борьбы с данным вирусом, но также и большое диагностическое значение. Из сравнения топологий нуклеотидной и аминокислотной дендрограмм следует вывод, что обе выявленные нами группы образцов из НСО не показывают внутригрупповых различий на аминокислотном уровне, что может означать серологическое сходство образцов в группе и перспективность разработки дифференциальной серологической диагностики для образцов из разных групп.

Заключение

Таким образом, при разработке ДНК- и иммунодиагностических систем для выявления PVY, циркулирующих в НСО, можно использовать в первую очередь генетические вариации вируса этих штаммовых кластеров.

Полученные результаты штаммовой принадлежности образцов из НСО закладывают основу для выяснения источника и путей проникновения конкретных штаммов вируса, а также для оценки фитопатогенетических рисков для используемых в НСО сортов картофеля.

Список литературы / References

- Батов А.С., Гуреева Ю.А. Сравнительное изучение отечественных среднеранних сортов картофеля в условиях лесостепи Новосибирского Приобья. *Изв. Оренбург. гос. аграр. ун-та*. 2023;1(99): 34-39. DOI 10.37670/2073-0853-2023-99-1-34-39
[Batov A.S., Gureeva Yu.A. Comparative study of domestic mid-early potato varieties in the forest-steppe conditions of the Novosibirsk Ob region. *Izvestia Orenburgskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Izvestia Orenburg State Agrarian University*. 2023;1(99):34-39. DOI 10.37670/2073-0853-2023-99-1-34-39 (in Russian)]
- Государственный реестр селекционных достижений допущенных к использованию. Том 1. Сорта растений [Электронный ресурс], URL: <https://gossortrf.ru/> (Дата обращения: 15.10.2023)
[State Register of Selection Achievements Authorized for Use for Production Purposes. Vol. 1. Plant Varieties [Web resource], URL: <https://gossortrf.ru/> (Access date: 15.10.2023) (in Russian)]
- Григорян М.А., Ткаченко О.В. Получение оздоровленного картофеля и диагностика вирусных заболеваний в условиях Энгельсского района Саратовской области. *Аграр. наука*. 2019;3:60-63. DOI 10.32634/0869-8155-2019-326-3-60-63
[Grigoryan M.A., Tkachenko O.V. Receiving improved potatoes and diagnostics of viral diseases under the conditions of the Engels area of the Saratov region. *Agrarnaya Nauka = Agrarian Science*. 2019;3:60-63. DOI 10.32634/0869-8155-2019-326-3-60-63 (in Russian)]
- Малько А.М., Живых А.В., Никитин М.М., Французов П.А., Стацюк Н.В., Джавахия В.Г., Голиков А.Г. Мониторинг вирусных инфекций картофеля с использованием матричной ПЦР-диагностики. *Картофель и овощи*. 2017;12:26-29
[Malko A.M., Zhiykh A.V., Nikitin M.M., Frantsuzov P.A., Statsyuk N.V., Dzhavakhiya V.G., Golikov A.G. Monitoring of potato viral diseases in different regions of Russia using real-time PCR matrix-based technology. *Kartofel' i Ovoschi = Potato and Vegetables*. 2017;12:26-29 (in Russian)]
- Печенкина В.А., Боронникова С.В. Зараженность вирусами X и Y посадочного материала сортов картофеля (*Solanum tuberosum* L.), выращиваемых в Пермском крае. *Бюлл. науки и практики*. 2020; 5:203-210
[Pechenkina V.A., Boronnikova S.V. Infection with X and Y viruses of planting material of potato varieties (*Solanum tuberosum* L.) grown in the Perm Krai. *Bulleten' Nauki i Praktiki = Bulletin of Science and Practice*. 2020;5:203-210 (in Russian)]
- Стахеев А.А., Усков А.И., Варицев Ю.А., Галушка П.А., Ускова Л.Б., Жевора С.В., Завриев С.К. Изучение изолятов Y-вируса картофеля, распространенных на территории различных регионов Российской Федерации, с использованием новых молекулярных маркеров. *Земледелие*. 2023;6:37-40. DOI 10.24412/0044-3913-2023-6-37-40
[Stakheev A.A., Uskov A.I., Varitsev Yu.A., Galushka P.A., Uskova L.B., Zhevara S.V., Zavriev S.K. Study of potato Y-virus isolates widespread in various regions of the Russian Federation using new molecular markers. *Zemledelie*. 2023;6:37-40. DOI 10.24412/0044-3913-2023-6-37-40 (in Russian)]
- Усков А.И., Варицев Ю.А., Бирюкова В.А., Галушка П.А., Варицева Г.П., Шмыгля И.В., Кравченко Д.В. 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 virus Y from different regions of the Russian Federation and Belarus. *Zemledelie*. 2016;8:36-38 (in Russian)]
- Фоминых Т.С., Иванова Г.П., Медведева К.Д. Мониторинг вирусных болезней картофеля в Псковской и Астраханской областях России. *Вестн. защиты растений*. 2017;4(94):29-34 [Fominykh T.S., Ivanova G.P., Medvedeva K.D. Monitoring of viral diseases of potatoes in the Pskov and Astrakhan regions of Russia. *Vestnik Zashity Rasteniy = Plant Protection News*. 2017;4(94):29-34 (in Russian)]
- Хайруллин Р.М., Гарифуллина Д.В., Веселова С.В., Черепанова Е.А., Максимов И.В. Пораженность картофеля вирусами в Республике Башкортостан и активность рибонуклеаз. *Вестн. защиты растений*. 2021;104(4):196-201. DOI 10.31993/2308-6459-2021-104-4-15075 [Khairullin R.M., Garifullina D.V., Veselova S.V., Cherepanova E.A., Maksimov I.V. Potato infection with viruses in the republic of Bashkortostan and ribonuclease activity in tubers. *Vestnik Zashity Rasteniy = Plant Protection News*. 2021;104(4):196-201. DOI 10.31993/2308-6459-2021-104-4-15075 (in Russian)]
- Ahmadvand R., Takács A., Taller J., Wolf I., Polgár Z. Potato viruses and resistance genes in potato. *Acta Agron. Hungarica*. 2012;60(3): 283-298. DOI 10.1556/AAgr.60.2012.3.10
- Byarugaba A.A., Mukasa S.B., Barekye A., Rubaihayo P.R. Interactive effects of *Potato virus Y* and *Potato leafroll virus* infection on potato yields in Uganda. *Open Agric*. 2020;5(1):726-739. DOI 10.1515/opag-2020-0073
- Chikh-Ali M., Rowley J.S., Kuhl J.C., Gray S.M., Karasev A.V. Evidence of a monogenic nature of the *Nz* gene conferring resistance against *Potato virus Y* strain Z (PVY^Z) in potato. *Am. J. Potato Res*. 2014;91:649-654. DOI 10.1007/s12230-014-9395-7
- Chikh-Ali M., Alruwaili H., Vander Pol D., Karasev A.V. Molecular characterization of recombinant strains of *Potato virus Y* from Saudi Arabia. *Plant Dis*. 2016a;100(2):292-297. DOI 10.1094/PDIS-05-15-0562-RE
- Chikh-Ali M., Bosque-Perez N., Vander Pol D., Sembel D., Karasev A.V. Occurrence and molecular characterization of recombinant *Potato virus Y*^{NTN} isolates from Sulawesi, Indonesia. *Plant Dis*. 2016b;100(2):269-275. DOI 10.1094/PDIS-07-15-0817-RE
- Danci O., Ziegler A., Torrance L., Gasemi S., Daniel M. Potyviridae family – short review. *J. Hortic. For. Biotechnol*. 2009;13:410-420
- Fox A., Collins L.E., Macarthur R., Blackburn L.F., Northing P. New aphid vectors and efficiency of transmission of *Potato virus A* and strains of *Potato virus Y* in the UK. *Plant Pathol*. 2017;66(2):325-335. DOI 10.1111/ppa.12561
- Green K.J., Brown C.J., Gray S.M., Karasev A.V. Phylogenetic study of recombinant strains of *Potato virus Y*. *Virology*. 2017;507:40-52. DOI 10.1016/j.virol.2017.03.018
- Green K.J., Brown C.J., Karasev A.V. Genetic diversity of *Potato virus Y* (PVY): sequence analyses reveal ten novel PVY recombinant structures. *Arch. Virol*. 2018;163(1):23-32. DOI 10.1007/s00705-017-3568-x
- Hameed A., Iqbal Z., Asad S., Mansoor S. Detection of multiple potato viruses in the field suggests synergistic interactions among potato viruses in Pakistan. *Plant Pathol. J*. 2014;30(4):407-415. DOI 10.5423/PPJ.OA.05.2014.0039
- Jones R.A.C. Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars. *Ann. Appl. Biol*. 1990;117(1):93-105. DOI 10.1111/j.1744-7348.1990.tb04198.x
- 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
- Kerlan C., Moury B. Potato virus Y. In: Mahy B.W.J., van Regenmortel M.H.V. (Eds.). *Encyclopedia of Virology*. San Diego: Academic Press, 2008;287-296. DOI 10.1016/B978-012374410-4.00737-8
- Kreuze J.F., Souza-Dias J.A.C., Jeevalatha A., Figueira A.R., Valkonen J.P.T., Jones R.A.C. Viral diseases in potato. In: Campos H., Ortiz O. (Eds.). *The Potato Crop*. Chap: Springer, 2020;389-430. DOI 10.1007/978-3-030-28683-5_11
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol*. 2018;35(6):1547-1549. DOI 10.1093/molbev/msy096
- Lacomme C., Jacquot E. General characteristics of *Potato virus Y* (PVY) and its impact on potato production: an overview. In: Lacomme C., Glais L., Bellstedt D., Dupuis B., Karasev A., Jacquot E. (Eds.). *Potato Virus Y: Biodiversity, Pathogenicity, Epidemiology and Management*. Cham: Springer, 2017;1-19. DOI 10.1007/978-3-319-58860-5_1
- Onditi J., Nyongesa M., van der Vlugt R. Prevalence, distribution and control of six major potato viruses in Kenya. *Trop. Plant Pathol*. 2021;46:311-323. DOI 10.1007/s40858-020-00409-x
- Scholthof K.B., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C., Foster G.D. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol*. 2011;12(9):938-954. DOI 10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x
- Szabó A.-K., Várallyay E., Demian E., Hegyi A., Galbács Z.N., Kiss J., Bálint J., Loxdale H.D., Balog A. Local aphid species infestation on invasive weeds affects virus infection of nearest crops under different management systems – A preliminary study. *Front. Plant Sci*. 2020;11:684. DOI 10.3389/fpls.2020.00684
- Uskov A.I., Varitsev Yu.A., Galushka P.A., Suslova N.V., Uskova L.B., Varitseva G.P., Zhevora S.V. Study of serological and phytopathological characteristics of potato Y-virus isolates distributed in various regions of the Russian Federation. *Dostizheniya Nauki i Tekhniki APK = Achievements of Science and Technology in Agro-industrial Complex*. 2022;36(10):18-22. DOI 10.53859/02352451_2022_36_10_18 (in Russian)

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 24.10.2023. После доработки 15.05.2024. Принята к публикации 15.05.2024.