



Solanum nigrum L. – резерватор вириода веретеновидности клубней картофеля

Н. В. Мироненко, А. В. Хютти, Е. И. Кырова, Н. М. Лашина, О. С. Афанасенко

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

Автор, ответственный за переписку: Нина Васильевна Мироненко, nina2601mir@mail.ru

Актуальность. Среди сорных растений семейства пасленовых, потенциальных резерваторов инфекции вириода веретеновидности клубней картофеля (ВВКК), паслен черный (*Solanum nigrum* L.) повсеместно распространен на территории России.

Материалы и методы. Молекулярную диагностику вириода проводили методом ПЦР с обратной транскрипцией с использованием праймеров РЗ/Р4, специфичных для ВВКК, и 6Pospi F/R, специфичных для семейства вириодов *Pospiviroidae*. Продукты амплификации клонировали и секвенировали, нуклеотидные последовательности депонировали в базе данных GenBank.

Результаты. Методом ОТ-ПЦР показано, что 80–100% растений, собранных в Нижнем Новгороде и Тульской области, были инфицированы ВВКК. кДНК-ампликоны двух растений из Нижнего Новгорода (Sn1 и Sn2) и одного растения из Тульской области (Sn3) клонировали, по три клона каждого, и секвенировали. Анализ нуклеотидной изменчивости клонов выявил существенные генетические различия между штаммами ВВКК, при этом связь с географическим происхождением штаммов не наблюдается. Мутации U120C и U192C относительно референсного штамма VP35 (LC523658) обнаружены у всех 9 клонов. Изолят Sn1 близок к «картофельному» изоляту VP35 и отличается от него тремя мутациями. Изолят Sn2 представлен тремя идентичными клонами и отличается от VP35 девятью мутациями, а Sn3 имеет 22 мутации в области 49–310 позиций нуклеотидов суммарно для трех клонов.

После искусственного заражения здоровых растений *S. nigrum* в условиях теплицы подтвержден факт наличия ВВКК в инфицированных растениях и доказано, что вириод передается семенами растениям следующей генерации.

Заключение. Впервые во внешне здоровых сорных растениях *S. nigrum* выявлен вириод веретеновидности клубней картофеля – ВВКК. Доказано, что вириод сохраняется в семенах *S. nigrum* и передается потомству. Обнаружена генетическая гетерогенность штаммов ВВКК, обитающих в растениях *S. nigrum*. Две мутации U120C и U192C были общими для всех тестируемых клонов изолятов ВВКК, обнаруженных в *S. nigrum*.

Ключевые слова: паслен черный, ВВКК, ОТ-ПЦР, секвенирование, мутации

Благодарности: работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 20-46-07001 «Молекулярно-генетические механизмы взаимоотношений в патосистеме *Solanum* spp. – вириод веретеновидности клубней картофеля (PSTVd) и особенности эпидемиологии вириода».

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Для цитирования: Мироненко Н.В., Хютти А.В., Кырова Е.И., Лашина Н.М., Афанасенко О.С. *Solanum nigrum* L. – резерватор вириода веретеновидности клубней картофеля. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2022;183(3):194-203. DOI: 10.30901/2227-8834-2022-3-194-203

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2022-3-194-203

Solanum nigrum L. is a potato spindle tuber viroid reservoir

Nina V. Mironenko, Alexander V. Khiutti, Elena I. Kyrova, Nina M. Lashina, Olga S. Afanasenko

*All-Russian Research Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia***Corresponding author:** Nina V. Mironenko, nina2601mir@mail.ru

Background. Among the weeds of the Solanaceae family, a potential viroid infection reservoir, black nightshade (*Solanum nigrum* L.), is ubiquitous in Russia.

Materials and methods. Molecular diagnostics of the viroid was performed using RT-PCR with the P3/P4 primers specific for PSTVd and 6Pospi F/R specific for the Pospiviroidae family of viroids. The amplification products were cloned and sequenced, and the nucleotide sequences were deposited in the GenBank database.

Results. RT-PCR showed that 80–100% of plants were infected with PSTVd. The cDNA amplicons of two plants from Nizhny Novgorod (Sn1 and Sn2) and one plant from Tula Province (Sn3) were cloned (3 clones each) and sequenced. An analysis of the nucleotide variability in the clones revealed significant genetic differences between the PSTVd strains, independent of the geographical origin. Mutations U120C and U192C, compared with the reference strain VP35 (LC523658), were found in all 9 clones. The Sn1 isolate was close to the “potato” VP35 isolate and differed from it only by three mutations. The Sn2 isolate was represented by three identical clones and differed from VP35 by nine mutations, while Sn3 had 22 mutations in the region of 49–310 nucleotide positions in total for three clones. After artificial infection of healthy *S. nigrum* plants in a greenhouse, the presence of PSTVd in infected plants was confirmed and it was proved that the viroid was transmitted by seeds to plants of the next generation.

Conclusion. For the first time in externally healthy plants of *S. nigrum*, widely distributed in the potato fields of Russia (Nizhny Novgorod and Tula Province), the potato spindle tuber viroid, PSTVd, was detected. It was proved that the viroid was preserved in the seeds of *S. nigrum* and transmitted to their progeny. Genetic heterogeneity of PSTVd strains from *S. nigrum* plants was found. Two mutations, U120C and U192C, were common for all tested clones of PSTVd strains.

Keywords: nightshade black, PSTVd, RT-PCR, sequencing, mutations

Acknowledgements: the research was supported by a grant from the Russian Science Foundation, No. 20-46-07001 “Molecular genetic mechanisms of relationships in the pathosystem of *Solanum* spp. – Potato spindle tuber viroid (PSTVd) and features of the viroid epidemiology”.

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

For citation: Mironenko N.V., Khiutti A.V., Kyrova E.I., Lashina N.M., Afanasenko O.S. *Solanum nigrum* L. is a potato spindle tuber viroid reservoir. *Proceedings of Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2022;183(3):194-203. DOI: 10.30901/2227-8834-2022-3-194-203

Введение

Картофель является одной из важнейших основных сельскохозяйственных культур во всем мире. По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН, более 360 миллионов тонн картофеля производится на более чем 19 миллионах гектаров сельскохозяйственных угодий во всем мире (<https://potatosystem.ru/globalnaya-statistika>). Растения картофеля, инфицированные ВВКК, отличаются отставанием в росте, изменением морфологии стеблей, листьев и деформацией клубней, что приводит к значительным потерям урожая, которые могут достигать 50–90% (Mackie et al., 2019). Патогены картофеля, такие как вирусы и вириды, распространяются по всему миру при экспорте и импорте клубней семенного картофеля. В бывшем СССР «готическая» болезнь картофеля, вызываемая виридом веретеновидности клубней картофеля, или ВВКК, впервые была зарегистрирована в начале 1930-х гг., а к концу 1980-х гг. ВВКК распространился в посадках картофеля в Центральном, Северо-Западном и Дальневосточном округах Российской Федерации (Kastalyeva et al., 1992; Owens et al., 2009). ВВКК был обнаружен более чем в 50% меристемной культуры *in vitro* (Kastalyeva et al., 1992), а также у некоторых сортов картофеля в Приморском крае на Дальнем Востоке (Romanova et al., 2007). R. A. Owens et al. (2009) исследовали более 30 изолятов ВВКК из коллекции Всероссийского НИИ фитопатологии, собранных в Центральном, Северо-Западном, Приволжском и Дальневосточном округах за 15-летний период, выявив 17 различных штаммов ВВКК в России.

ВВКК имеет широкий круг хозяев – по крайней мере, 138 видов из десяти семейств (Singh, 1973). Естественная инфекция ВВКК была обнаружена в полевых условиях в основном в пасленовых культурах, таких как перец, петунья, картофель и томат (Owens, Verhoeven, 2017). Известно, что ВВКК передается механически, в том числе от больных растений других видов пасленовых картофеля и томату (Verhoeven, Roenhorst, 2010) и, так же как и вирусы, тлями (Syller et al., 1997). Была показана вертикальная трансмиссия от пыльцы в семена картофеля и горизонтальная – пылью с зараженных растений (Singh et al., 1992; Matsushita et al., 2018).

Среди сорных растений семейства пасленовых, потенциальных резервуаров инфекции вирида, повсеместно распространенным на территории России является паслен черный (*Solanum nigrum* L.). На юге России распространены паслен колючий (*S. cornutum* Lam.) и паслен каролинский (*S. carolinense* L.), которые также спорадически могут быть обнаружены на Дальнем Востоке. Имеется лишь одно сообщение об обнаружении ВВКК

в растениях *S. nigrum* – в Австралии в 2010 г. (Mackie et al., 2016). В литературе отсутствуют дополнительные сведения о том, что виды паслена могут являться резервуарами инфекции ВВКК в полевых условиях.

Целью исследования являлось изучение возможной роли *Solanum nigrum* как резервуара виридной инфекции.

Материалы и методы

Листья растений *Solanum nigrum* были собраны на картофельных посадках в Пушкинском, Гатчинском, Кировском районах Ленинградской области, а также в Нижегородской и Тульской областях (табл. 1). Внешне здоровые растения *S. nigrum* (рис. 1, слева) были выкопаны и высажены в 5-литровые горшки в теплице и культивированы в теплице Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений (ВИЗР) до образования ягод (рис. 1, справа).

Инокуляция ВВКК растений *S. nigrum*

Для изучения возможности трансмиссии вирида с семенами паслена в условиях теплицы ВИЗР растения *S. nigrum* в фазе цветения и начала плодообразования были инокулированы среднеагрессивным штаммом VP87 (LC523667), депонированным нами в международной информационной базе данных DDBJ (DNA Data Bank of Japan), Data set “Viruses” (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/blastn?lang=ja>), поддерживаемым на сорте томата ‘Rutgers’. Для инокуляции листья среднего яруса растений *S. nigrum* посыпали порошком карборунда и осторожно растирали его по поверхности листьев пластиковым пестиком. На поврежденную поверхность листа наносили 10 мкл инокулята и растирали стерильным пластиковым пестиком.

Для инокуляции использовали свежий сок инфицированных растений томата сорта ‘Rutgers’ через 60 дней после инокуляции ВВКК штаммом VP87. Для приготовления инокулята 0,1 г листьев томата измельчали в 1 мл натрий-фосфатного буфера (pH 7,0) и фильтровали через стерильную марлю.

Диагностика ВВКК методом ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией) и секвенирование

Тотальную РНК экстрагировали из 0,1 г листовой пластинки с использованием набора RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Германия) в соответствии с инструкциями производителя (http://www.genome.duke.edu/cores/microarray/services/rna-qc/documents/RNeasy_Mini_Handbook.pdf). Для выявления виридов использовали наборы праймеров РЗ/Р4, специфичные для ВВКК (Ве-

Таблица 1. Происхождение растений *Solanum nigrum* L., собранных на посадках картофеля и использованных в работе

Table 1. Origin of *Solanum nigrum* L. plants collected from potato fields and used in the work

Географическое происхождение / Geographic origin	Поле с картофелем сорта / Field with the potato cultivar	Количество растений <i>S. nigrum</i> , взятых для выделения РНК / Number of <i>S. nigrum</i> plants taken for RNA extraction
Ленинградская обл. / Leningrad Prov.	Неизвестно / Unknown	30
Нижегородская обл. / Nizhny Novgorod Prov.	Гала / Gala	9
Тульская обл. / Tula Prov.	Аризона / Arizona	10



Рис. 1. *Solanum nigrum* L. на картофельном поле в Кировском районе Ленинградской области (Путилово) (слева) и созревшие семена в условиях теплицы (справа)

Fig. 1. *Solanum nigrum* L. in a potato field in Putilovo, Kirovsky District, Leningrad Province (on the left), and mature seeds in a greenhouse (on the right)

hjatnia et al., 1996), и праймеры 6Pospi F/R, специфичные для семейства виридов Pospiviroidae (Yanagisawa et al., 2017). Для ОТ-ПЦР использовали набор реагентов One-Step RT-PCR Kit (QIAGEN) в соответствии с инструкциями производителя. Для позитивного контроля амплификации ВВКК использовали растения томата сорта 'Rutgers', зараженные ВВКК.

ОТ-ПЦР проводили на термоциклере MyCycler (Bio-Rad, Калифорния, США) при 50°C в течение 30 мин, 94°C в течение 2 мин, с последующими 35 циклами 94°C в течение 30 с, 60°C в течение 30 с и 72°C в течение 30 с. Дополнительную стадию элонгации проводили при 72°C в течение 5 мин с последующим хранением при 12°C. Размер диагностических фрагментов виридов с праймерами РЗ/Р4 – 360 пн, с праймерами 6Pospi F/R – 260 пн. Продукты амплификации элюировали из 1.5% агарозного

геля, очищали с помощью набора Cleanup Standard и передавали для последующего клонирования и секвенирования в фирму Beagle (Санкт-Петербург, Россия).

Секвенировали по три клон каждого образца в обоих направлениях. Выравнивание и ручное редактирование нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программного обеспечения Vector NTI Advance 10 (Thermo Fisher Scientific). Нуклеотидные последовательности идентифицировали по степени сходства с последовательностями, депонированными в международной базе NCBI GenBank и в поисковой системе BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Идентифицированные нуклеотидные последовательности депонировали в базе данных GenBank; номера депонированных штаммов вирида приведены в таблице 2.

Таблица 2. Анализ нуклеотидных последовательностей штаммов ВВКК, обнаруженных в растениях *Solanum nigrum* L.

Table 2. Nucleotide sequence analysis of PSTVd strains found in *Solanum nigrum* L. plants

Регион сбора <i>S. nigrum</i> / <i>S. nigrum</i> collection area	Название изолята ВВКК / PSTVd strain name	Название клона / Clone name	Размер ампликона (пн) / Amplicon size	GenBank acc. No.	Наиболее близкая последовательность ВВКК в BLAST / The closest sequence of PSTVd in BLAST	
					Acc. No.	Растение-хозяин, страна / Host plant, country
Нижний Новгород / Nizhny Novgorod Prov.	Sn1	Sn1-1	260	ON478339	KR611362	<i>S. tuberosum</i> , Китай / China
		Sn1-2	260	ON478340		
		Sn1-3	260	ON478341	KR611359	
	Sn2	Sn2-1	260	ON478342	LC654170	<i>S. tuberosum</i> , Россия / Russia
		Sn2-2	260	ON478343		
		Sn2-3	260	ON478344		
Тульская обл. / Tula Prov.	Sn3	Sn3-1	360	ON478345	M25199	<i>S. commersonii</i> , Нидерланды / Netherlands
		Sn3-2	360	ON478346		
		Sn3-3	360	ON478347		

Филогенетическое дерево было построено методом UPGMA. Построение дерева осуществляли в программе Mega X (Kumar et al., 2018). Нуклеотидную изменчивость клонов ампликонов с праймерами, специфичными для виридов сем. *Pospiriviroidae*, изучали методом выравнивания нуклеотидных последовательностей с помощью алгоритма M-Coffee (Notredame et al., 2000).

Результаты

Диагностика ВВКК в растениях *S. nigrum*, произрастающих в посадках картофеля

Из листьев была выделена РНК и проведена ОТ-ПЦР-диагностика с ВВКК специфичными праймерами. Пример ОТ-ПЦР-диагностики с праймерами Р3/Р4 приведен на рисунке 2.

У растений *S. nigrum* были получены в основном слабые продукты амплификации с ВВКК-специфичными праймерами. Для доказательства присутствия ВВКК в растениях *S. nigrum* выбрали три наиболее ярких ампликона, которые были клонированы и секвенированы – по три клон каждого образца. Характеристика ампликонов представлена в таблице 2.

На дендрограмме (рис. 3), построенной по нуклеотидным последовательностям клонов трех изолятов ВВКК, обнаруженных в растениях *S. nigrum*, показаны генетические расстояния между клонами трех изолятов и тремя штаммами из базы GenBank: VP35 (LC523658), выделенным из картофеля, и штаммами CVN209 и CVN212 (KP454037 и KJ857498), выделенными из *S. nigrum* в Австралии (Mackie et al., 2016). Очевидно, что клоны Sn1 составили самостоятельный кластер, в который также во-

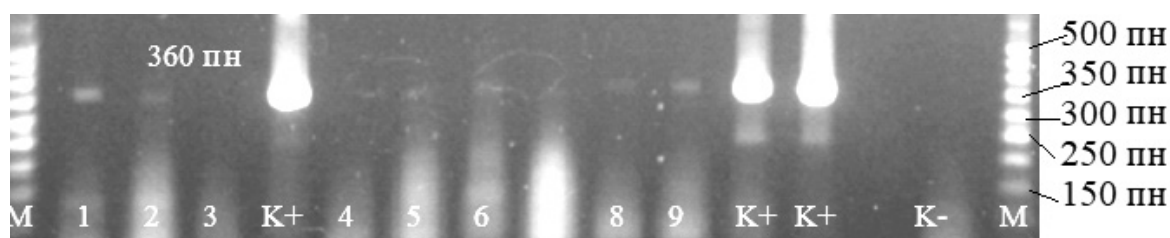


Рис. 2. Обнаружение ВВКК с помощью ОТ-ПЦР с праймерами Р3/Р4 в растениях *Solanum nigrum* L.: 1–9 – растения из Нижнего Новгорода; К+ – положительные контроли (томат сорта 'Rutgers', зараженный штаммом ВВКК VP87); К– – негативный контроль (вода); М – маркер молекулярных весов 50 пн (Primetech DNA Ladder)

Fig. 2. RT-PCR detection of PSTVd in *Solanum nigrum* L. plants using the P3/P4 primer set: 1–9 – plants from Nizhny Novgorod; K+ – positive control (tomato cv. Rutgers, infected with strain PSTVd VP87); K– – negative control (water); M – molecular weight marker 50 bp (PrimeTech DNA Ladder)

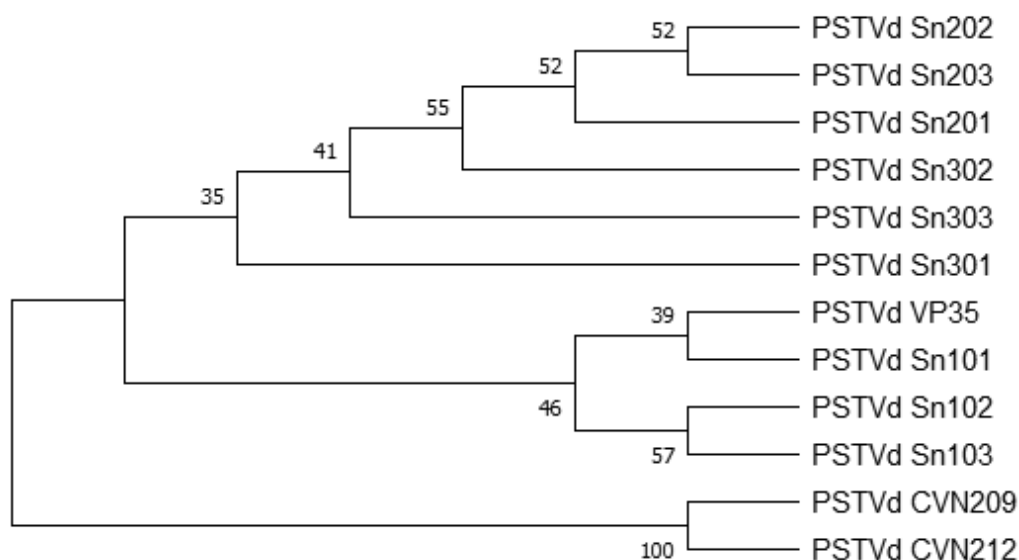


Рис. 3. Генетическое родство штаммов ВВКК, выделенных из *Solanum nigrum* L.: VP35 – референсный штамм, выделен из картофеля в России; CVN209 и CVN212 – штаммы ВВКК, выделенные из *S. nigrum* в Австралии; Sn101–103 – клоны штамма Sn1; Sn201–203 – клоны штамма Sn2; Sn301–303 – клоны штамма Sn3

Fig. 3. Genetic relationship of PSTVd strains isolated from *Solanum nigrum* L.: VP35 is a reference strain isolated from potatoes in Russia; CVN209 and CVN212 are PSTVd strains isolated from *S. nigrum* in Australia; Sn101–103 are clones of strain Sn1; Sn201–203 are clones of strain Sn2; Sn301–303 are clones of strain Sn3

шел референсный изолят ВВКК VP35. Причем австралийские изоляты объединились в один кластер с российскими штаммами Sn1 и VP35, хотя генетически от них отличаются, что подтверждено высоким значением бутстрэпа. Клоны двух других изолятов, Sn2 и Sn3, составили другой кластер геномов вириода. Очевидно, что два кластера не связаны с географическим происхождением изолятов ВВКК: из Нижегородской и Тульской областей РФ.

Нуклеотидные последовательности всех клонов изолятов ВВКК Sn1–Sn3 сравнили между собой и с референсным штаммом VP35 в части генома вириода в позиции от 49 до 310 нуклеотидов, что соответствует размеру ампликона 260 пн. В результате у всех 9 клонов обнаружены мутации U120C и U192C относительно референсного штамма VP35 (табл. 3). У обоих австралийских штаммов наблюдается одна общая с российскими штаммами, выделенными из *S. nigrum*, мутация U192C и другая мутация U120– (делеция). Вряд ли можно считать мутации U120C и U192C «хозяин-специфичными», так как такие же мутации относительно референсного штамма VP35 встречаются и у других штаммов «картофельного» происхождения, например U120C и U192C у NicTr3 (LC654171) и U192C у штаммов VP87 (LC523667), VP69-2 (LC523666), VP72-1 (LC523663) и VP2 (LC523662), распространенных в РФ.

Изолят Sn1 отличался от «картофельного» изолята VP35 только тремя мутациями – U120C, U192C у трех клонов и мутацией C231A у Sn1-1. Изолят Sn2 был представлен тремя идентичными клонами и отличался от VP35

девятью мутациями, а Sn3, наоборот, отличался гетерогенностью клонов и имел в исследуемой области генома 22 мутации суммарно для трех клонов, причем мутации A309C и C310U отличали клоны Sn3 от клонов Sn1 и Sn2, а также от референсного штамма (см. табл. 3).

Изучение возможности сохранения и распространения ВВКК с семенами *S. nigrum*

Из свежих листьев здоровых растений *S. nigrum* и растений картофеля с признаками деформации (скручивание листьев, морщинистость, мелкие листья, задержка роста), растущих на одном поле в Ленинградской области, была выделена РНК и проведена ОТ-ПЦР-диагностика на наличие вириода. Диагностический ампликон, подтверждающий наличие ВВКК, не был обнаружен ни в одном из образцов *S. nigrum* и картофеля. В то же время в растениях картофеля и *S. nigrum* методом мультиплексной ОТ-ПЦР был выявлен вирус скручивания листьев картофеля – PRLV (potato leaf roll virus) (данные не приведены).

В условиях теплицы растения *S. nigrum* в фазе цветения и в начале плодоношения инокулировали штаммом ВВКК VP87 (LC523667.1). Через три месяца после инокуляции ВВКК был идентифицирован у трех из 19 протестированных растений *S. nigrum* (рис. 4, дорожки 9, 12 и 17).

С инфицированных растений собирали семена, чтобы определить, может ли вириод передаваться с семенами. В 15-дневных проростках проводили молекулярную диагностику ВВКК (рис. 5).

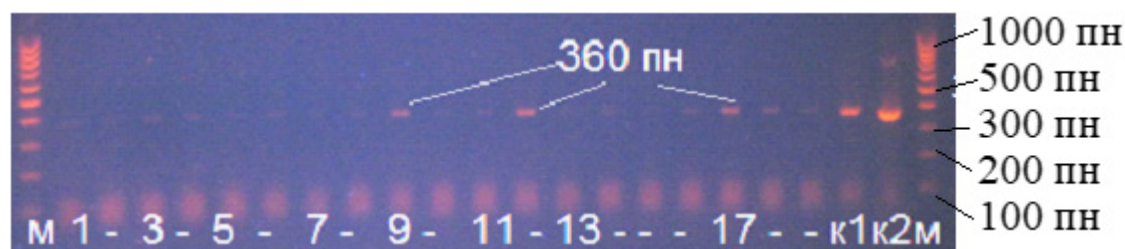


Рис. 4. Обнаружение ВВКК с помощью ОТ-ПЦР в растениях *Solanum nigrum* L. (1–19) через три месяца после инокуляции штаммом VP87: дорожки 9, 12 и 17 – диагностические продукты амплификации; 19 – вода; к1 и к2 – положительные контроли; М – маркер молекулярного веса 100 пн (Gene Ruler, Fermentas)

Fig. 4. RT-PCR detection of PSTVd in *S. nigrum* (1–19) plants 3 months after inoculation with strain VP87: lines 9, 12 and 17 – diagnostic amplification products; 19 – water; k1 and k2 – positive controls; M – molecular weight marker 100 bp (Gene Ruler, Fermentas)

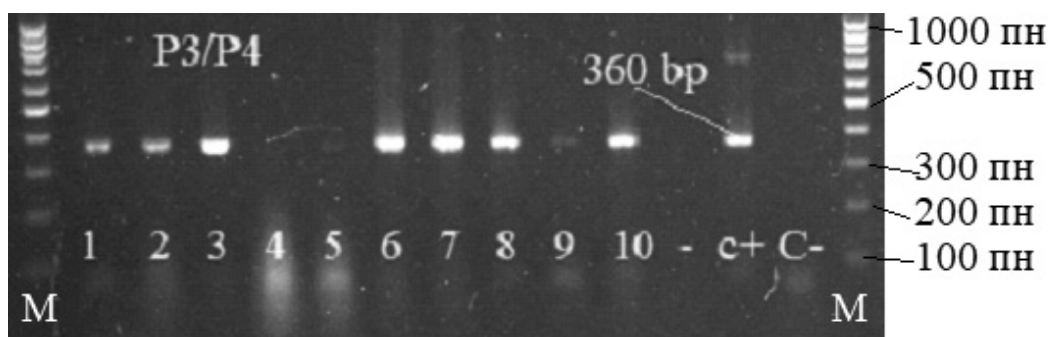


Рис. 5. Обнаружение ВВКК в растениях *Solanum nigrum* L. с использованием набора праймеров P3/P4 с помощью ОТ-ПЦР:

1–10 – проростки семян от зараженных растений *S. nigrum*; C+ – томат; инфицированный VP87; C– – вода; М – маркеры молекулярных весов 100 пн (Gene Ruler, Fermentas)

Fig. 5. RT-PCR detection of PSTVd in *Solanum nigrum* L. plants using the P3/P4 primer set: 1–10 – seedlings from seeds of infected *S. nigrum* plants; C+ – tomato infected with VP87; C– – water; M – molecular weight markers 100 bp (Gene Ruler, Fermentas)

Таблица 3. Мутации в клонах штаммов ВВКК, выделенных из *Solanum nigrum* L.
Table 3. Mutations in clones of PSTVd strains isolated from *Solanum nigrum* L.

Клон / Clone	Замены/инсерции/делеции нуклеотидов в разных позициях генома ВВКК (относительно LC523658) / Nucleotide substitutions/insertions/deletions at different positions of the PSTVd genome (relative to LC523658)																				
	P							C					V				TR				
	49	53	63	64	67	309	310	115	117	119	120	255	140	231	213	145	192	200	205	211	212
VP35	G	A	A	G	G	A	C	G	C	A	U	C	C	G	C	G	U	G	U	C	G
Sn1-1	G	A	A	G	G	A	C	G	C	A	C	C	C	A	C	G	C	G	U	C	G
Sn1-2	G	A	A	G	G	A	C	G	C	A	C	C	C	G	C	G	C	G	U	C	G
Sn1-3	G	A	A	G	G	A	C	G	C	A	C	C	C	G	C	G	C	G	U	C	G
Sn2-1	+A	A	A	G	G	A	C	G	+A	A	C	C	+C	G	C	+C	C	U	U	-	A
Sn2-2	+A	A	A	G	G	A	C	G	+A	A	C	C	+C	G	C	+C	C	U	U	-	A
Sn2-3	+A	A	A	G	G	A	C	G	+A	A	C	C	+C	G	C	+C	C	U	U	-	A
Sn3-1	+A	+A	A	G	C	C	U	G	+A	A	C	U	+C	G	U	+C	C	U	U	-	A
Sn3-2	G	+A	C	G	G	C	U	G	C	+A	C	C	+C	G	C	+C	C	U	U	-	A
Sn3-3	+A	A	A	U	G	C	U	+C	+A	A	G,+C	U	+C	G	C	+C	C	U	U	A	-

Примечание: P – домен патогенности; C – центральный консервативный регион; V – варибельный регион; TR – терминальный правый домен (по: Keese, Symons, 1985); «+» – инсерция; «-» – делеция нуклеотида

Note: P – pathogenicity domain, C – central conserved region; V – variable region; TR – terminal right domain (from Keese, Symons, 1985); “+” – insertion; “-” – deletion of nucleotide

У 8 из 10 проростков семян от зараженных растений *S. nigrum* методом ОТ-ПЦР получены диагностические фрагменты с праймерами P3/P4, свидетельствующие о наличии в этих растениях ВВКК, что подтверждает факт переноса вириода семенами.

Обсуждение результатов

Solanum nigrum распространен в Евразии, Америке, Австралии и Южной Африке. Этот вид считается хозяином для многих вирусов, поражающих пасленовые культуры (Ma et al., 2020).

Ранее было показано, что *S. nigrum*, произрастающий на посадках картофеля, является резервуаром вириода CSVd (*Chrysanthemum stunt viroid*), тоже относящегося к сем. Pospiviroidae, и может способствовать распространению этого вириода среди растений картофеля (Matsushita, Penmetcha, 2009; Matsushita, 2013). Этот вириод чаще всего поражает хризантемы и родственные им декоративные растения. CSVd был обнаружен в 30% исследованных растений *S. nigrum*, собранных на Дальнем Востоке (Matsushita et al., 2021).

ВВКК впервые был выявлен в растениях *S. nigrum* в условиях субтропического климата в Австралии в 2010 г. (Mackie et al., 2016). Мы обнаружили ВВКК в растениях *S. nigrum* в двух регионах РФ – Нижнем Новгороде и Тульской обл. Факт обнаружения вириода в растениях паслена методом ОТ-ПЦР со специфическими праймерами был подтвержден секвенированием продуктов амплификации и идентификацией их в системе BLAST. Изучена нуклеотидная последовательность клонов выделенных изолятов ВВКК – Sn1 и Sn2 из Нижнего Новгорода и Sn3 из Тульской области – и проведено сравнение с референсным «картофельным» штаммом ВВКК (VP35) и двумя депонированными штаммами ВВКК, выделенными из *S. nigrum* в Австралии – KJ857498 и KP454037 (Mackie et al., 2016).

На участке 260 пн (49–310 позиции в геноме референсного штамма) наблюдали существенную нуклеотидную изменчивость в сравнении со штаммом VP35 (см. табл. 3). Мутации у штаммов ВВКК из *S. nigrum* были зафиксированы в 21-й нуклеотидной позиции относительно референсного штамма.

В 1985 г. была предложена модель структуры ВВКК из пяти вириодных доменов: левый терминальный (TL), включающий нуклеотиды с 1 по 46 и 316–359, домен патогенности (P) – 46–74 позиции нуклеотидов и 288 и 316, центральный консервативный регион (C) – 74–120 и 241–288 позиции, вариабельный регион (V) – 120–140 и 212–241 и терминальный правый домен (TR) – 140–212 (Keese, Symons, 1985). Считается, что домен P, который также называют VMR (virulence-modulating region), ответственен за вирулентность штамма ВВКК (Schmitz, Riesner, 1998), и несколько изменений нуклеотидов в домене P могут резко повлиять на симптомы у томата (Sano et al., 1992; Qi, Ding, 2003). Распределение мутаций по доменам вириодного генома у штаммов Sn1–Sn3 было практически одинаковым в доменах P, C и TR – по 7, 5 и 6 мутаций соответственно. Какой-либо особенности мутаций в домене P выявлено не было.

Внутриштаммовая изменчивость отмечена только для штамма Sn3, что согласуется с концепцией «квази-вида» для ВВКК (Adkar-Purushothama et al., 2020).

Полученные данные свидетельствуют о существовании естественного резервуара инфекции ВВКК в сорных растениях картофельного поля *S. nigrum* и возможности сохранения и распространения инфекции с семенами

паслена. Для доказательства трансмиссии вириода от *S. nigrum* к картофелю необходимы дополнительные исследования.

Заключение

Впервые в сорных растениях *Solanum nigrum*, распространенных на картофельных полях в условиях РФ (Нижний Новгород и Тульская область), выявлен вириод веретеновидности клубней картофеля – ВВКК. Молекулярную диагностику вириода провели методом ОТ-ПЦР и секвенированием отдельных клонов продуктов амплификации. Обнаружена генетическая гетерогенность трех штаммов ВВКК, обитающих в растениях *S. nigrum*, охарактеризована внутри- и межштаммовая нуклеотидная изменчивость и выявлены две мутации, общие для всех тестируемых клонов штаммов ВВКК, обнаруженных в растениях *S. nigrum*. Доказано, что вириод сохраняется в семенах *S. nigrum* и передается потомству.

References / Литература

- Adkar-Purushothama C.R., Bolduc F., Bru P., Perreault J.P. Insights into potato spindle tuber viroid quasi-species from infection to disease. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11:1235. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01235
- Behjatnia A., Dry I., Krake L., Condé B.D., Connolly M.I., Randles J. et al. New potato spindle tuber viroid and tomato leaf curl geminivirus strains from a wild *Solanum* sp. *Phytopathology*. 1996;86:880-886. DOI: 10.1094/Phyto-86-880
- Kastalyeva T.B., Mozhaeva K.A., Pisetskaya N.F., Romanova S.A., Trofimets L.N. The potato spindle tuber viroid and bringing potato into a healthy state (Viroid veretеновидности клубней i оздоровлениye kartofelya). *Vestnik of the Russian Agricultural Science*. 1992;(3):22-24. [in Russian] (Кастальева Т.Б., Можеева К.А., Писецкая Н.Ф., Романова С.А., Трофимец Л.Н. Вириод веретеновидности клубней и оздоровление картофеля. *Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук*. 1992;(3):22-24).
- Keese P., Symons R.H. Domains in viroids: evidence of inter-molecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82(14):4582-4586. DOI: 10.1073/pnas.82.14.4582
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 2018;35(6):1547-1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096
- Ma Y., Marais A., Lefebvre M., Faure C., Candresse T. Metagenomic analysis of virome cross-talk between cultivated *Solanum lycopersicum* and wild *Solanum nigrum*. *Virology*. 2020;540:38-44. DOI: 10.1016/j.virol.2019.11.009
- Mackie A.E.; Barbetti M.J.; Rodoni B., McKirdy S., Jones R.A.C. Effects of a potato spindle tuber viroid tomato strain on the symptoms, biomass, and yields of classical indicator and currently grown potato and tomato cultivars. *Plant Disease*. 2019;103(12):3009-3017. DOI: 10.1094/PDIS-02-19-0312-RE
- Mackie A.E., Rodoni B.C., Barbetti M.J., McKirdy S.J., Jones R.A.C. Potato spindle tuber viroid: alternative host reservoirs and strain found in a remote subtropical irrigation area. *European Journal of Plant Pathology*. 2016;145:433-446. DOI: 10.1007/s10658-016-0857-2
- Matsushita Y. *Chrysanthemum stunt viroid*. *Japan Agricultural Research Quarterly*. 2013;47(3):237-247. DOI: 10.6090/jarq.47.237

- Matsushita Y., Penmetcha K.K.R. *In vitro* transcribed *Chrysanthemum* stunt viroid (CSVd) RNA is infectious to chrysanthemum and other plants. *Phytopathology*. 2009;99(1):58-66. DOI: 10.1094/PHYTO-99-1-0058
- Matsushita Y., Yanagisawa H., Khiutti A., Mironenko N., Ohto Y., Afanasenko O. Genetic diversity and pathogenicity of potato spindle tuber viroid and chrysanthemum stunt viroid isolates in Russia. *European Journal of Plant Pathology*. 2021;161(3):529-542. DOI: 10.1007/s10658-021-02339-z
- Matsushita Y., Yanagisawa H., Sano T. Vertical and horizontal transmission of pospiviroids. *Viruses*. 2018;10(12):706. DOI: 10.3390/v10120706
- Notredame C.; Higgins D.G.; Heringa J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology*. 2020;302(1):205-217. DOI: 10.1006/jmbi.2000.4042.
- Owens R.A., Girsova N.V., Kromina K.A., Lee I.M., Mozhaeva K.A., Kastalyeva T. Russian isolates of potato spindle tuber viroid exhibit low sequence diversity. *Plant Disease*. 2009;93(7):752-759. DOI: 10.1094/PDIS-93-7-0752
- Owens R.A., Steger G., Hu Y., Fels A., Hammond R.W., Riesner D. RNA structural features responsible for potato spindle tuber viroid pathogenicity. *Virology*. 1996;222(1):144-158. DOI: 10.1006/viro.1996.0405
- Owens R.A., Verhoeven J.Th.J. Potato spindle tuber viroid. In: A. Hadidi, R. Flores, J. Randles, P. Palukaitis (eds). *Viroids and Satellites*. London; Academic Press; 2017. p.149-158. DOI: 10.1016/B978-0-12-801498-1.00014-0
- Romanova S.A., Volkov Y., Kakareka N., Pleshakova T.I., Koslovskaya Z.N. Potato disease caused by combined infection with potato spindle tuber viroid and potato virus Y necrotic strain. *Russian Agricultural Sciences*. 2007;33(3):162-165. DOI: 10.3103/S1068367407030081
- Qi Y., Ding B. Inhibition of cell growth and shoot development by a specific nucleotide sequence in a noncoding viroid RNA. *The Plant Cell*. 2003;15(6):1360-1374. DOI: 10.1105/tpc.011585
- Sano T., Candresse T., Hammond R.W., Diener T.O., Owens R.A. Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(21):10104-10108. DOI: 10.1073/pnas.89.21.10104
- Schmitz A., Riesner D. Correlation between bending of the VM region and the pathogenicity of different potato spindle tuber viroid strains. *RNA*. 1998;4(10):1295-1303. DOI: 10.1017/s1355838298980815
- Singh R.P. Experimental host range of the potato spindle tuber 'virus'. *American Potato Journal*. 1973;50(4):111-123. DOI: 10.1007/BF02857207
- Singh R.P., Boucher A., Somerville T.H. Detection of potato spindle tuber viroid in the pollen and various parts of potato plant pollinated with viroid-infected pollen. *Plant Disease*. 1992;76:951-953. DOI: 10.1094/PD-76-0951
- Syller J., Marczewski W., Pawłowicz J. Transmission by aphids of potato spindle tuber viroid encapsidated by potato leafroll luteovirus particles. *European Journal of Plant Pathology*. 1997;103:285-289. DOI: 10.1023/A:1008648822190
- Verhoeven J.T.J., Roenhorst J.W. High stability of original predominant pospiviroid genotypes upon mechanical inoculation from ornamentals to potato and tomato. *Archives of Virology*. 2010;155(2):269-274. DOI: 10.1007/s00705-009-0572-9
- Yanagisawa H., Shiki Y., Matsushita Y., Ooishi M., Takaue N., Tsuda S. Development of a comprehensive detection and identification molecular based system for eight pospiviroids. *European Journal of Plant Pathology*. 2017;149(1):11-23. DOI: 10.1007/s10658-017-1157-1

Информация об авторах

Нина Васильевна МIRONENKO, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, 196608 Россия, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, 3, nina2601mir@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-3383-2973>

Александр Валерьевич ХЮТТИ, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, 196608 Россия, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, 3, alexanderkhyutti@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-1479-7746>

Елена Игоревна КЫРОВА, аспирант, младший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, 196608 Россия, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, 3, blairkot@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-1016-2148>

Нина Михайловна ЛАШИНА, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, 196608 Россия, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, 3, nlashina@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-1419-7134>

Ольга Сильвестровна АФАНАСЕНКО, доктор биологических наук, профессор РАН, ведущий научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, 196608 Россия, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, 3, olga.s.afan@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0001-7368-0797>

Information about the authors

Nina V. Mironenko, Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher, All-Russian Research Institute of Plant Protection, 3 Podbelskogo Hwy., Pushkin, St. Petersburg 196608, Russia, nina2601mir@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-3383-2973>

Alexander V. Khiutti, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, All-Russian Research Institute of Plant Protection, 3 Podbelskogo Hwy., Pushkin, St. Petersburg 196608, Russia, alexanderkhyutti@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-1479-7746>

Elena I. Kyrova, Postgraduate Student, Associate Researcher, All-Russian Research Institute of Plant Protection, 3 Podbelskogo Hwy., Pushkin, St. Petersburg 196608, Russia, blairkot@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-1016-2148>

Nina M. Lashina, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, All-Russian Research Institute of Plant Protection, 3 Podbelskogo Hwy., Pushkin, St. Petersburg 196608, Russia, nlashina@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-1419-7134>

Olga S. Afanasenko, Dr. Sci. (Biology), Professor of the RAS, Leading Researcher, All-Russian Research Institute of Plant Protection, 3 Podbelskogo Hwy., Pushkin, St. Petersburg 196608, Russia, olga.s.afan@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0001-7368-0797>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 14.05.2022; одобрена после рецензирования 17.06.2022; принята к публикации 06.09.2022.
The article was submitted on 14.05.2022; approved after reviewing on 17.06.2022; accepted for publication on 06.09.2022.