

# Разработка ПЦР-тест системы для выявления вириода веретеновидности клубней картофеля

Е.А. Бессолицына, А.В. Харина

Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого (ФГБНУ ФАНЦ Северо-Востока), г. Киров  
Bess2000@mail.ru

## Аннотация

Вириод веретеновидности клубней картофеля поражает растения картофеля, нанося серьезный урон сельскому хозяйству за счет снижения урожайности. Поэтому существует необходимость выявления данного возбудителя. Вириоды представляют собой молекулы РНК, поэтому для их выявления не подходят иммунологические методы и классический ПЦР. Цель данной работы – разработка метода для выявления вириода веретеновидности клубней картофеля. Были подобраны праймеры для реакции обратной транскрипции и последующей ПЦР, рассчитаны температуры отжига и размер амплифицируемого фрагмента. Проверены праймеры и условия реакции на растительном материале. Получены ПЦР-продукты рассчитанного размера. Определение их нуклеотидной последовательности подтвердило выявление генетического материала вириода веретеновидности клубней картофеля. Таким образом, данная ПЦР-тест система может быть использована для выявления вириода картофеля и стать основой для выявления вириодов других овощных культур.

## Ключевые слова:

вириод веретеновидности клубней картофеля, ВВКК, PSTVd, ПЦР-тест система

## Введение

Болезнь картофеля “веретеновидность клубней”, получившая название из-за характерного симптома – удлиненной формы клубней, впервые была описана в США в 1922 г. В СССР заболевание впервые отмечено на Украине в 1937 г. [1]. Возбудителем оказался представитель неизвестного ранее класса патогенов, названного позднее вириодами (т.е. «вирусоподобный»).

Вириоды – ковалентно замкнутые, очень короткие кольцевые одноцепочечные молекулы РНК. Вириоды лишены белковой оболочки и не кодируют никакого белка. По причине простоты своего строения они выработали способы использовать исключительно клеточные белки для поддержания своего существования. Реплицируются вириоды полностью за счет ферментов растения-хозяина [2, 3].

Вириод веретеновидности клубней картофеля (ВВКК; род *Pospiviroid*) – первый в череде открытых в дальнейшем вириодов.

# Development of a PCR-test system for detection of the Potato spindle tuber viroid

E.A. Bessolitsyna, A.V. Kharina

Federal Agricultural Research Center of the North-East named after N.V. Rudnitsky (FARC of the North-East), Kirov  
Bess2000@mail.ru

## Abstract

The Potato spindle tuber viroid infects potato plants, causing a serious damage to agriculture by reducing yields. Therefore, there is a need to identify this pathogen. Viroids are RNA molecules and so cannot be detected with the immunological methods and the classical PCR. The aim of this work is to develop a method for detection of the Potato spindle tuber viroid. Primers have been selected for the reverse transcription reaction and the subsequent PCR, the annealing temperatures and the size of the amplified fragment have been calculated. Primers and reaction conditions have been tested on plant material. PCR products of the calculated size have been obtained. Determination of their nucleotide sequence confirmed the identification of the genetic material of the Potato spindle tuber viroid. Thus, this PCR test system can be used for detection of the Potato viroid and become the basis for detection of other vegetable crops' viroids.

## Keywords:

Potato spindle tuber viroid, PSTVd, PCR-test system

Ярко выраженные типичные симптомы поражения: появление деформированных листьев (морщинистость, скручивание), отставание в росте и даже карликовость, появление клубней веретеновидной, грушевидной или гантелеобразной форм, с выпуклыми глазками и выраженными “бровями” и/или трещинами, усиленное образование плодов, из которых лишь немногие созревают [4]. При заражении ВВКК в растении отмечаются значительные физиологические и биохимические изменения, что приводит, как правило, к снижению продуктивности картофеля. Данное явление происходит за счет уменьшения массы одного клубня и количества клубней на одно растение, однако структура урожая изменяется в меньшей степени, чем его величина. Уменьшение продуктивности зависит от длительности культивирования инфицированного картофеля, сорта, изолята (штамма) ВВКК, агротехники и др. и может колебаться от 20–30 до 90–100 % [5].

В конце 1980-х и начале 1990-х гг. вирусная инфекция картофеля стала широко распространенным явлением в России, особенно в Центральном и Северо-Западном регионах, а также на Дальнем Востоке [5]. Это нетипичное событие, поскольку вирусные болезни прежде наблюдались в регионах с более теплыми и сухими погодными условиями, а в Центральном регионе заражение картофеля ВВКК обычно не превышало 5 %. В настоящее время вирус – распространенный патоген, вредоносность которого возрастает в случае массового инфицирования картофеля, особенно при последующих репродукциях [6].

Таким образом, возникает необходимость выявления данного патогена в посадочном материале для контроля его распространения. Однако вирус представляет собой молекулу РНК, а не ДНК, следовательно, стандартный метод полимеразной цепной реакции не подходит. С другой стороны, РНК вируса не связана с белками, соответственно, иммунологические методы, хорошо зарекомендовавшие себя при выявлении вирусов, также не подходят [7].

Следовательно, цель данной работы – разработка метода выявления РНК вируса веретеновидности клубней картофеля (ВВКК или PSTVd) методом обратной транскрипции с полимеразной цепной реакцией.

## Материалы и методы

Последовательности геномов вируса веретеновидности клубней картофеля (ВВКК или PSTVd) были скопированы из базы данных Genome, или Nucleotide [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Названия последовательностей и их паспортные номера представлены в табл. 1.

В качестве источника нуклеиновых кислот использовались пазушные почки клубня картофеля и покровная ткань вокруг них. Суммарные нуклеиновые кислоты выделялись с помощью модификации гуанидинтиоизоцианатного метода [8].

Реакцию обратной транскрипции проводили следующим образом: 50 нг РНК в 4 мкл воды добавляли по 1 мкл обратного праймера в концентрации 40 пМ/мкл, прогревали при 95 °С 5 мин, затем добавляли 1 мкл 10X буфера для обратной транскрипции, 1 мкл смеси dNTPs (концентрация 4 мМ), 1 мкл обратной транскриптазы MMLV (15 е.а./мкл) (Сибэнзим) и воду до 10 мкл. Полученную смесь инкубировали при 37 °С 1 ч 10 мин. Затем переосаждали и вносили на реакцию ПЦР: 2 мкл раствора матрицы и обратной транскрипции, 1 мкл буфера, 0,5 мкл смеси dNTPs (концентрация 4 мМ), по 1 мкл праймеров концентрация каждого 10 пМ/мкл, 0,75 мкл Taq-полимеразы (5 е.а./мкл) (Сибэнзим) и воду до 10 мкл. Полимеразную цепную реакцию проводили в следующих условиях: 1 цикл 95 °С – 5 мин, 35 циклов по 95 °С – 30 сек, 42 °С – 30 сек, 72 °С – 30 сек, 1 цикл 72 °С – 8 мин. Продукты амплификации разделялись в 6 %-ном нативном полиакриламидном геле, который окрашивался бромистым этидием [8].

ПЦР продукты экстрагировали из геля [8] и определяли нуклеотидную последовательность в фирме Евроген.

## Результаты и их обсуждение

Вирус, вызывающий веретеновидность клубней картофеля, с одной стороны, вызывает серьезные уменьшения урожайности картофеля, с другой – не имеет в своей структуре белка, что не дает возможности использовать иммунологические методы, с третьей стороны, в качестве генетического материала у данного возбудителя является РНК, следовательно, нет возможности использовать стандартные методы ПЦР. Именно поэтому был выбран метод обратной транскрипции, совмещенной с полимеразной цепной реакцией.

Выбрано 15 последовательностей изолятов вируса веретеновидности клубней картофеля (ВВКК или PSTVd) в базе данных [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), результаты представлены в табл. 1.

Далее последовательности проанализированы в программе AliBee - Multiple alignment Release 3.0 на сайте <http://www.genebee.msu.su/genebee.html>. В выявленных консервативных участках отбирали фрагменты 20–25 нуклеотидов, начинающихся и заканчивающихся на гуанин или цитозин (предполагаемые праймеры). Затем проверяли их температуру отжига и уникальность в программе nucleotide blast [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), с присвоением номеров от 0 – последовательность не выявляется в нужных видах и генах, до 10 – последовательность выявляется только в геномах вирусов веретеновидности клубней картофеля и больше нигде.

Из табл. 2 были выбраны уникальные праймеры с одинаковыми температурами отжига и вручную рассчитан размер ожидаемого ампликона. Эти праймеры представлены в табл. 3 вместе с размером ожидаемого ампликона (ПЦР продукта). Данные праймеры представлены в табл. 3, там же указан размер ПЦР продукта, который составил 273 п.н.

Выбраны последовательности для праймеров № 4 и № 11 из табл. 2, их температура отжига различалась всего на 1 °С, причем уникальность во всех случаях составляла 10 пунктов по шкале уникальности, т.е. данные фрагменты выявляются только в последовательностях вируса веретеновидности клубней картофеля (ВВКК или PSTVd). Далее праймеры были заказаны в фирме Синтол. Для анализа использованы образцы пазушных почек клубней картофеля, так как растущие ткани более пригодны для выделения ДНК как ткани с меньшим размером клеточных стенок и большим объемом генетического материала. Клубни предоставлены с фермерского поля в Куменском районе Кировской области.

Было выбрано восемь клубней с прорастающими пазушными почками, из которых брался материал для обратной транскрипции и ПЦР. Полученный результат представлен на рис. 1. Как видно из фотографии, положительными были образцы № 1 и № 6. В отрицательном контроле полосы продуктов отсутствуют, что свидетельствует о чистоте реактивов, а также о не взаимодействии праймеров между собой в процессе амплификации. Наличие дополнительной полосы длиной меньше 100 п. н. указывает на неспецифический отжиг в геноме вируса, но не в геноме растения-хозяина. Если бы отжиг происходил в ДНК картофеля, полоса бы

Названия изолятов вириода веретеновидности клубней картофеля (ВВКК, или PSTVd) и их идентификационные номера в базе данных [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

Таблица 1

Table 1

Names of the Potato spindle tuber viroid (PSTVd) isolates and their identification numbers in the database [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

№	Название	Идентификационный номер
1	Potato spindle tuber viroid (PSTVd) strain RG 1, complete genome	PSU23058
2	Potato spindle tuber viroid (PSTVd) strain QF B, complete genome	PSU23060
3	Potato spindle tuber viroid (PSTVd) strain QF A, complete genome	PSU23059
4	Potato spindle tuber viroid isolate PSTVd ChalkV74, complete	GU481092
5	Potato spindle tuber viroid isolate PSTVd KalV66, complete genome	GU481091
6	Potato spindle tuber viroid isolate PSTVd KorV25, complete genome	GU481090
7	Potato spindle tuber viroid strain SXIII, complete genome, isolate PSTVd S27-VI-106	Y08852
8	Potato spindle tuber viroid, variant PSTVd I2-I-14	Y09891
9	Potato spindle tuber viroid isolate PSTVd Sj 403-Slo, complete sequence	JN559763
10	Potato spindle tuber viroid complete genome, isolate PSTVd Nb	AJ634596
11	Potato spindle tuber viroid, variant PSTVd I4-I-42	Y09889
12	Potato spindle tuber viroid, variant PSTVd I2-VI-27	Y09888
13	Potato spindle tuber viroid complete genome	KJ857498
14	Potato spindle tuber viroid isolate PSTVd_Int5e, complete genome	AY937193
15	Potato spindle tuber viroid isolate PSTVd_Int5d, complete genome	AY937192

Последовательности, использованные для праймеров

Таблица 2

Sequences used to obtain primers

Table 2

№	Вирус	Положение праймера	Последовательность	Длина	T отж., °C	Уникальность 1 – 10
1	PSTVd	1 - 26	CGGAАСТААСТСГТGGTTCCTGTG	25	57	10
2	PSTVd	12 - 45	СТСГТGGTTCCTGTGGTTCACAC	23	57	10
4	PSTVd	16 - 42	ГТТСТГТGGTTCACACCTGACCTCC	26	60	10
5	PSTVd	65 - 90	GGCGGCTCGGAGGAGCGCTTCAGGG	25	67	10
6	PSTVd	72 - 98	СТСГGAGGAGCGCTTCAGGGATCCCC	26	65	10
7	PSTVd	73 - 99	СGGAGGAGCGCTTCAGGGATCCCCGG	26	67	10
8	PSTVd	91 - 117	CCCГGGGAAACCTGGAGCGAАСТGGC	26	65	10
9	PSTVd	217 - 241	GCGCTGTCGCTTCGGCTACTACCC	24	62	10
10	PSTVd	228 - 254	СGGCTACTACCCGGTGGAAACAАСТG	26	60	10
11	PSTVd	264 - 289	GGTGGAAACAАСТGAAGCTCCCGAG	25	59	10
12	PSTVd	294 - 319	СGGGGCGAGGGTGTTAGCCCTTGG	25	64	10
13	PSTVd	294 - 321	GGCGAGGGTGTTAGCCCTTGGAAACCG	27	63	10
14	PSTVd	323 - 351	GGTGTTAGCCCTTGGAAACCGAGTTGG	28	63	10
15	PSTVd	334 - 358	GCCCTTGGAAACCGAGTTGGTTC	24	61	10

Таблица 3

Последовательность праймеров для выявления вириода веретеновидности клубней картофеля (ВВКК или PSTVd)

Table 3

Primer sequence for detection of the Potato spindle tuber viroid (PSTVd)

Название	Последовательность	T отжига, °C	Размер ампликона
PSTVd 1 For	5' — GTTCTGTGGTTCACACCTGACCTCC — 3'	60 °C	273 п. н.
PSTVd 1 Rev	5' - СТСGGGAGCTTCAGTTGTTCCACC - 3'	59 °C	

присутствовала во всех образцах. В образце № 1 полоса слабее – это связано с меньшим количеством материала для амплификации, в образце № 6 полоса достаточно яркая.

ПЦР продукты были амплифицированы с образцов № 1 и № 6, выделены из геля и отправлены на определение

К.А. Можяева // Известия ТСХА. – 2010. – Т. 2, № 62. – С. 35–43.

- Москалев, А.В. Биологические эффекты виридов / А.В. Москалев [и др.] // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2018. – Т. 2, № 62. – С. 209–214.

нуклеотидной последовательности, проводили автоматически в компании Евроген.

Получена данная последовательность нуклеотидов: TCTC GGGAGCTTCAGTTGTTCCACCTGTT TCCSTTAAAGGTCTCGGGAGGTCAG GTGTAACCACAGGAAC. Она короче, чем размер ПЦР продукта, так как секвенирование ПЦР продуктов затруднено, поэтому был переведен в текстовый редактор только тот участок, в котором были наиболее точные результаты капиллярного гель-электрофореза.

Полученная последовательность проанализирована в Nucleotide blast [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Результаты представлены на рис. 2.

В итоге было доказано, что данная последовательность от-

носится к вириодам веретеновидности клубней картофеля (ВВКК или PSTVd) с вероятностью 100 %.

## Заключение

Вириод веретеновидности клубней картофеля (ВВКК, или PSTVd) наносит существенный урон урожайности картофеля. Нами разработана и успешно используется ПЦР-тест система для точного выявления генетического материала данного возбудителя в растениях.

## Литература

- Cordingley, M.G. Viruses agents of evolutionary invention / G. Michael Cordingley. – Harvard: Harvard Univ. Press, 2019. – 400 p.
- Hammond, R.W. Viroids: new and continuing risks for horticultural and agricultural crops/ R.W. Hammond, A.R. Owens // APSnet Features. – 2006.
- Гнутова, Р.В. Вирусные и вириодные болезни картофеля на Дальнем Востоке и методы их диагностики в семеноводстве / Р.В. Гнутова,

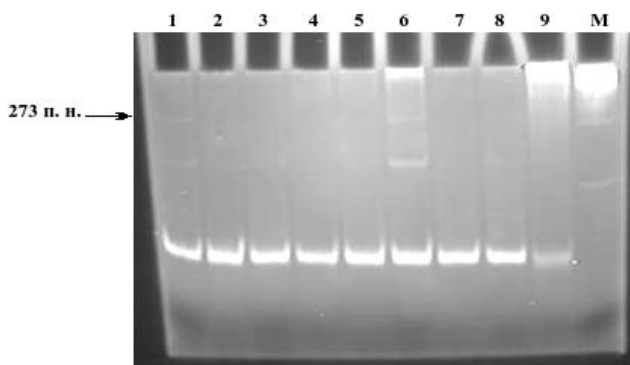


Рисунок 1. Гель-электрофорез в нативном ПААГ 6 % RT-ПЦР вируса PSTVd, дорожки 1–8 – образцы картофеля № 1–8, 9 – отрицательный контроль, М – маркер длин фрагментов ДНК Сибэнзим. Ожидаемый размер ампликона PSTVd – 273 п. н.

Figure 1. Gel electrophoresis in native PAAG 6 % RT-PCR of PSTVd virus, lanes 1–8 – potato samples № 1–9 – negative control, M – DNA fragment length marker Sibenzyme. The expected size of the PSTVd amplicon is 273 bp.

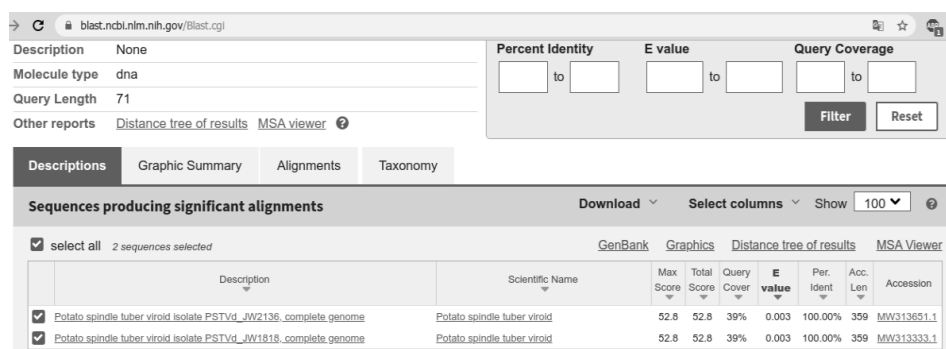


Рисунок 2. Результаты проверки нуклеотидной последовательности в Blast(www.ncbi.nlm.nih.gov).

Figure 2. Blast sequencing results (www.ncbi.nlm.nih.gov).

5. Можаяева, К.А. Продуктивность картофеля, инфицированного виридом веретенovidности клубней картофеля / К.А. Можаяева // Известия ТСХА.– 2011. – № 6. – С. 60–68.
6. Mehle, N. Survival and transmission of Potato virus Y, Pepino mosaic virus, and the Potato spindle tuber viroid in water / N. Mehle [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2014. –Vol. 80 (4). – P. 1455–1462.
7. Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual / J. Sambrook, T. Fritch, T. Maniatis. – NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – 1626 p.

## References

1. Cordingley, M.G. Viruses agents of evolutionary invention / G. Michael Cordingley. – Harvard: Harvard Univ. Press, 2019. – 400 p.
2. Hammond, R.W. Viroids: new and continuing risks for horticultural and agricultural crops/ R.W. Hammond, A.R. Owens // APSnet Features. – 2006.
3. Gnutova, R.V. Virusnyye i viroidnyye bolezni kartofelya na Dal'nem Vostoke i metody ikh diagnostiki v semenovodstve [Viral and viroid diseases of potato in the Far East and methods of their diagnostics in seed production] / R.V. Gnutova, K.A. Mozhayeva // Izvestia TSKhA [Journal "News of the Timiryazev Agricultural Academy"]. – 2010. Vol. 2. – № 62. – P. 35–43.
4. Moskalev, A.V. Biologicheskiye efekty viroidov [Biological effects of viroids] / A.V. Moskalev // Vestnik ossiyskoy voyenno-meditsinskoy akademii [Bulletin of the Russian Military Medical Academy]. – 2018. Vol. 2. – № 62. – P. 209–214.
5. Mozhayeva, K.A. Produktivnost' kartofelya, infitsirovannogo viroidom veretenovidnosti klubney kartofelya [Productivity of potatoes infected with the Potato spindle tuber viroid] / K.A. Mozhayeva // Izvestiya TSKHA [Journal "News of the Timiryazev Agricultural Academy"]. – 2011. – № 6. – P. 60–68.

6. Mehle, N. Survival and transmission of Potato virus Y, Pepino mosaic virus, and the Potato spindle tuber viroid in water / N. Mehle [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. 2014. – Vol. 80 (4). – P. 1455–1462.
7. Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual / J. Sambrook, T. Fritch, T. Maniatis. – NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – 1626 p.

## Информация об авторах:

**Бессолицына Екатерина Андреевна** – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики и селекции Федерального аграрного научного центра Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого (Федеральное государственное научное учреждение Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого; 610007, Российская Федерация, г. Киров, ул. Ленина, д. 166а, тел.: 8 (922) 919-79-70 (моб.); e-mail: bess2000@mail.ru).

**Харина Анастасия Владимировна** – кандидат сельскохозяйственных наук, заведующая лабораторией молекулярной генетики и селекции Федерального аграрного научного центра Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого (Федеральное государственное научное учреждение Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого; 610007, Российская Федерация, г. Киров, ул. Ленина, д. 166а, тел.: 8 (909) 140-41-27 (моб.); e-mail: Khavchas@yandex.ru).

**About the authors:**

**Ekaterina A. Bessolitsyna** – Candidate of Sciences (Biology), Researcher, Laboratory of Molecular Genetics and Breeding, FARC of the North-East (Federal Agricultural Research Center of the North-East named after N.V. Rudnitsky, 166a Lenina st., Kirov, 610007, Russian Federation; phone: 8 (922) 919-79-70 (mobile); e-mail: bess2000@mail.ru).

**Anastasiya V. Kharina** – Candidate of Sciences (Agriculture), Head of the Laboratory of Molecular Genetics and Breeding, FARC of the North-East (Federal Agricultural Research Center of the North-East named after N.V. Rudnitsky, 166a Lenina st., Kirov, 610007, Russian Federation; phone: 8 (909) 140-41-27 (mobile); e-mail: Khavchas@yandex.ru).

**Для цитирования:**

Бессолицына, Е.А. Разработка ПЦР-тест системы для выявления вирида веретеновидности клубней картофеля / Е.А. Бессолицына, А.В. Харина // Известия Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук. Серия «Сельскохозяйственные науки». – 2022. – № 6 (58). – С. 84–88. УДК 578.522. DOI 10.19110/1994-5655-2022-6-84-88

**For citation:**

Bessolitsyna, E.A. Razrabotka PTsR-test sistemy dlya vyyavleniya viroida veretenovidnosti klubnei kartofelya [Development of a PCR-test system for detection of the Potato spindle tuber viroid] / E.A. Bessolitsyna, A.V. Kharina // Proceedings of the Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences. Series "Agricultural Sciences". – 2022. – № 6 (58). – P. 84–88. UDC 578.522. DOI 10.19110/1994-5655-2022-6-84-88

Дата поступления рукописи: 24.05.2022

Прошла рецензирование: 31.10.2022

Принято решение о публикации: 31.10.2022

Received: 24.05.2022

Reviewed: 31.10.2022

Accepted: 31.10.2022