

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 578.2:632.3:633.491

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ
ВИРОИДА ВЕРЕТЕНОВИДНОСТИ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ
ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ВСЕРОССИЙСКОГО
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИНСТИТУТА ФИТОПАТОЛОГИИ

© 2013 г. Т. Б. Кастальева^{1*}, Н. В. Гирсова¹, К. А. Можяева¹, Ing Ming Lee², R. A. Owens²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии Россельхозакадемии, Большие Вяземы, Московская обл., 143050, Россия

²Molecular Plant Pathology Laboratory (USDA/ARS), Beltsville, MD 20705, USA

Поступила в редакцию 28.03.2012 г.

Принята к печати 25.04.2012 г.

Определена полная нуклеотидная последовательность более чем ста изолятов вириода веретеновидности клубней картофеля (ВВКК), собранных в различных местностях на территории России и бывшего СССР. Обнаружено 42 варианта первичных структур, каждый из которых содержит от одной до десяти мутаций по сравнению с “intermediate”, или типичным (эталонным), штаммом ВВКК (GenBank Acc. No. V01465). Наиболее часто встречаются изоляты, содержащие от двух до пяти мутаций; 24 варианта последовательностей описаны здесь впервые. В 21 изоляте ВВКК имеется мутация, до сих пор обнаруживавшаяся только у российских и украинских изолятов, — замена аденина в положении 121 на цитозин (A121C). Большинство изолятов содержат по две мутации — делецию одного из трех остатков аденина в положении 118-120 и замену аденина в позиции 121 на урацил или цитозин (-A120, A121U/C). Обе комбинации мутаций имеют фенотипически нейтральный характер, т.е. не влияют на характер симптомов болезни томата сорта Ратджерс. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей различных изолятов ВВКК, представленных в настоящей работе, и последовательностей других природных изолятов из базы данных позволяет разделить все известные ВВКК на четыре группы. Первая — изоляты из картофеля, томата и декоративных культур семейства *Solanaceae*, для которой типичный (“эталонный”) штамм ВВКК (PSTVd.018) может рассматриваться в качестве “родоначальника”. Вторая группа — изоляты из картофеля, томата и декоративных культур из семейства *Solanaceae*, в которой изолят PSTVd.123 играет ту же роль, что изолят PSTVd.018 в первой группе. Третья — изоляты из картофеля, “родоначальной” последовательностью в которой может быть последовательность изолята PSTVd.125. Четвертая и филогенетически наиболее далеко отстоящая группа изолятов ВВКК значительно отличается от первых трех. Большая часть изолятов этой группы происходит из Новой Зеландии и Австралии, они инфицируют различные виды растений из семейства пасленовых (томат, перец, физалис, картофель и другие).

Ключевые слова: вириод веретеновидности клубней картофеля (ВВКК), первичная и вторичная структура ВВКК, патогенность ВВКК, частота встречаемости мутаций.

MOLECULAR PROPERTIES OF POTATO SPINDLE TUBER VIROID (PSTVD) ISOLATES FROM THE COLLECTION OF THE RUSSIAN RESEARCH INSTITUTE OF PHYTOPATHOLOGY, by T. B. Kastalyeva^{1*}, N. V. Girsova¹, K. A. Mozhaeva¹, Ing-Ming Lee², R. A. Owens² (¹Russian Research Institute of Phytopathology, Bolshie Vyazomy, Moscow Region, 143050 Russia, *e-mail: kastalyeva@vniif.ru; ²Molecular Plant Pathology Laboratory (USDA/ARS), Beltsville, MD 20705, USA). The complete nucleotide sequences of more than 100 isolates of PSTVd collected from locations in the territory of Russia and the former USSR have been determined. These sequences represent 42 individual sequence variants, each containing 1–10 mutations with respect to the “intermediate” or type strain of PSTVd (GenBank Acc. No. v01465). Isolates containing 2–5 mutations were the most common, and 24 sequence variants are described here for the first time. Twenty one isolates contained a mutation found only in Russian and Ukrainian isolates of PSTVd up till now; i.e., replacement of the adenine at position 121 with cytosine (A121C). Many of these isolates contained two mutations — deletion of one of the three adenine residues occupying positions 118-120 plus replacement of the adenine at position 121 with either

Принятые сокращения: ВВКК, PSTVd — вириод веретеновидности клубней картофеля (Potato Spindle Tuber Viroid); ВНИИФ — Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии; ВНИИКХ — Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства.

* Эл. почта: kastalyeva@vniif.ru

uracil or cytosine (A120, A121U/C). Both combinations of mutations were phenotypically neutral, i.e. symptom expression in Rutgers tomato was unaffected. Phylogenetic analysis of the sequences of different PSTVd isolates presented in work together with sequences of other naturally-occurring isolates obtained from Internet databases suggesting that known PSTVd isolates may be divided into four groups: i) a group of isolates from potato, tomato and solanaceous ornamentals where the type strain of PSTVd (PSTVd.018) may be considered to represent the ancestral sequence, ii) a group of isolates from potato, tomato and solanaceous ornamentals where PSTVd.123 play the same role as PSTVd.018 for the first group, and iii) a group of potato isolates where PSTVd.125 is a possible ancestral sequence. The fourth and most divergent group of PSTVd isolates differs significantly from these first three groups. The majority of isolates in this group originate from New Zealand and Australia and infect different solanaceous hosts (tomato, pepper, cape gooseberry, potato, and others).

Keywords: *Potato Spindle Tuber Viroid* (PSTVd), viroid primary and secondary structure, viroid pathogenicity, mutation frequency.

Болезнь картофеля “веретеновидность клубней”, получившая название из-за характерного симптома — удлиненной формы клубней, впервые описана в США в 1922 г. [1], хотя причина заболевания была установлена только в 1971 г. [2]. Возбудителем оказался представитель неизвестного ранее класса патогенов, названного позднее “виридами”, которые представляют собой короткую, высоко структурированную, ковалентно замкнутую, автономно реплицирующуюся РНК, не кодирующую никакого белка [3]. Вириод веретеновидности клубней картофеля (ВВКК) — первый в череде открытых в дальнейшем вириодов (в настоящее время их известно более 30) и первый патоген эукариот, полная нуклеотидная последовательность которого установлена [4].

В 1937 г. в Украине было отмечено заболевание картофеля неизвестной этиологии, названное “готика” за вытянутый габитус больных растений [5]. В 70-х гг. прошлого века доказано, что возбудителем “готики” является ВВКК [6, 7]. Для заболевания, кроме готического габитуса, было типично появление деформированных листьев (морщинистость, скручивание), отставание в росте и даже карликовость, появление клубней веретеновидной или грушевидной формы с выпуклыми глазками и выраженными “бровями” и/или трещинами. В зависимости от симптомов, которые развиваются в ответ на инфицирование ВВКК растения-индикатора — восприимчивого к этому вириоду томата сорта Ратджерс, различают три штамма ВВКК: суровый (severe), промежуточный (или умеренный, intermediate) и мягкий (mild). Суровые штаммы могут приводить к гибели растения, инфицирование мягкими штаммами вызывает слабые симптомы, а иногда бывает и бессимптомным. В России для обозначения подобных штаммов грибов и бактерий используют термины “высокопатогенный”, “умереннопатогенный” и “слабопатогенный” соответственно. В случае вирусов и вириодов такая терминология пока не закрепились.

Первый изолят ВВКК, последовательность которого прочитана и депонирована в GenBank — PSTVd.001 (Acc. no. M16826). Это типичный уме-

ренный (“intermediate”) штамм ВВКК, содержащий 359 н. (рис. 1). В последующие годы в GenBank зарегистрировано еще несколько изолятов с идентичной последовательностью: PSTVd.018 (V01465), PSTVd.046 (NC_002030), PSTVd.048 (AF454395), PSTVd.087 (AY492082) и PSTVd.104 (AY937179). В молекуле ВВКК различают пять структурных/функциональных доменов: домен, связанный с патогенностью, центральный домен, варибельный домен и два терминальных — левый и правый. Благодаря Уотсон–Криковским связям вторичная структура образует короткую палочку, содержащую 27 участков с неспаренными основаниями (петли), причем некоторые из них (например, петля Е, расположенная в центральном домене) содержат спаренные основания, связи в которых отличаются от классических связей Уотсона–Крика [8].

В конце 1980-х и начале 1990-х гг. вириодная инфекция картофеля была широко распространена в РФ, особенно в Центральном и Северо-Западном регионах, а также на Дальнем Востоке [9]. Это нетипичное событие, поскольку вириодная инфекция прежде наблюдалась в регионах с более теплыми и сухими погодными условиями, например, в Поволжье. В Центральном регионе заражение картофеля ВВКК обычно не превышало 5%, что не приводило к экономически значимым потерям и не создавало угрозы эпифитотии. Масса клубней, инфицированных ВВКК, значительно меньше, они не соответствуют стандарту, поэтому для посадочного материала, и поэтому, как правило, отбраковываются.

В 1980-е гг. семенной картофель освобождали от вирусов с помощью культуры апикальной меристемы в сочетании с термотерапией, что стало причиной эпифитотии. Сама по себе прогрессивная технология оказалась не достаточно отработана: исходный материал, отбирившийся для элиминации вирусов, не проверяли на наличие ВВКК; инструменты для черенкования меристемных растений не стерилизовали. К тому же повышение температуры при термотерапии и выращивании миниклубней в теплице создавало благоприятные условия для репликации ВВКК,

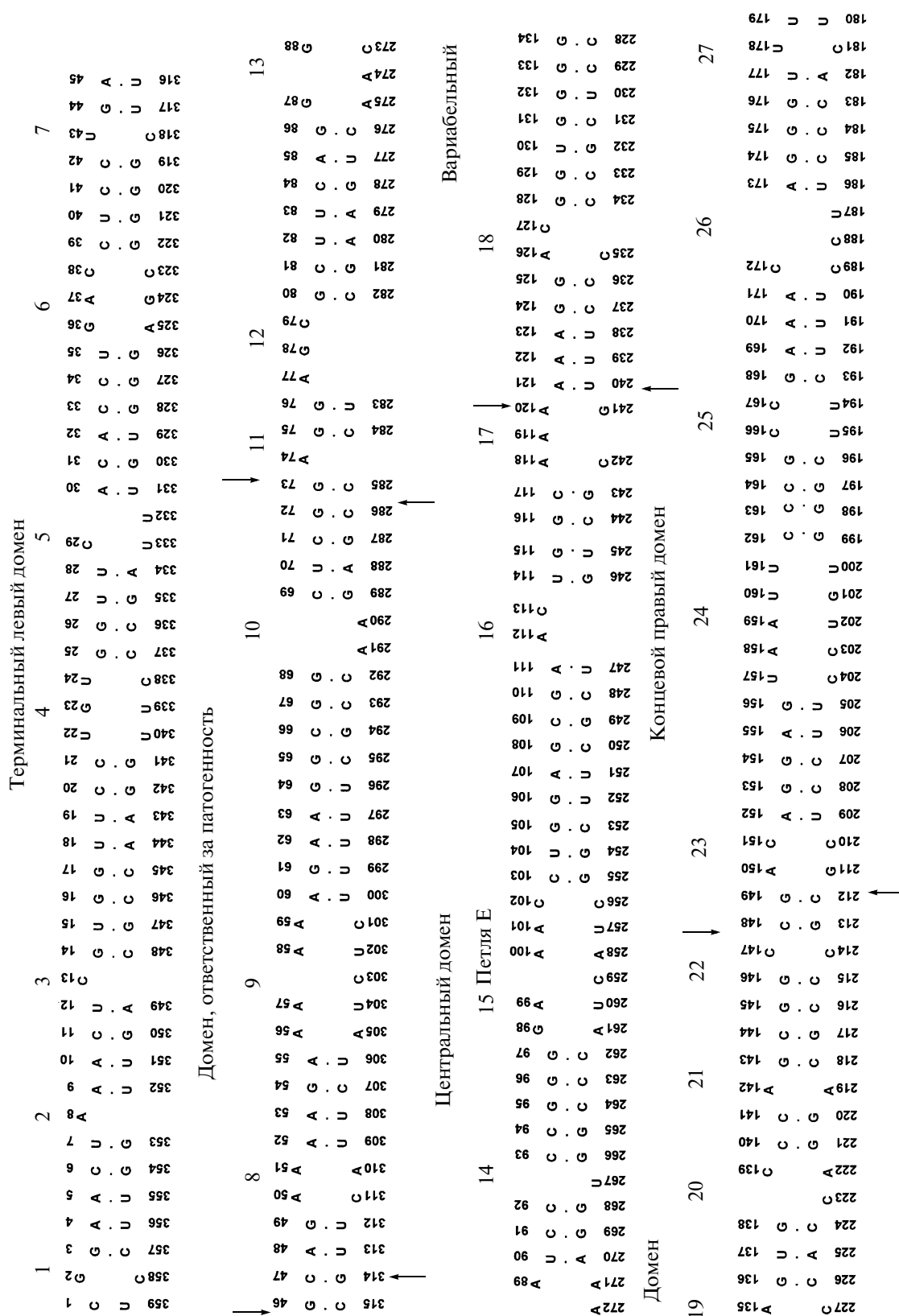


Рис. 1. Первичная и вторичная структура ВВКК. Стрелки указывают границы пяти структурных/функциональных доменов (см. [3]).

что и способствовало широкому распространению патогена.

В разгар эпифитотии во ВНИИФ была составлена коллекция изолятов ВВКК из клубней, взятых от растений с выраженными симптомами инфицирования. Эта коллекция поддерживалась путем ежегодного воспроизводства клубней в полевых условиях. Помимо различных районов Центрального региона, инфицированные клубни получены из Поволжья, Северо-Западного региона и Дальнего Востока. Первоначально виroidную инфекцию тестировали, проверяя выделенную из листьев картофеля низкомолекулярную РНК на растениях-индикаторах (томаты сорта Ратджерс и пасленовом растении *Scopolia sinensis* Hemsl.), при помощи электрофореза в полиакриламидном геле или молекулярной гибридизации с радиоактивно меченным зондом [10]. С 2006 г. стали использовать современные методы определения ВВКК – полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и молекулярную гибридизацию без радиоактивной метки.

Кроме инфицированных клубней, коллекция ВНИИФ включает более двадцати изолятов ВВКК, которые хранятся при температуре -20°C в виде растворов низкомолекулярной РНК, выделенной из инфицированных растений в 1980–90-х гг. Начиная с 2006 г. коллекция ВВКК ВНИИФ ежегодно пополняется. В 2009 г. опубликованы данные о тридцати девяти изолятах из коллекции ВНИИФ, 17 из которых отличаются по первичной структуре, а 16 из них описаны впервые [11]. За последние два года мы секвенировали еще 65 изолятов ВВКК; кроме российских, секвенированы изоляты из Украины, Грузии и Армении. В целом, благодаря финансовой поддержке МНТЦ партнерского проекта № 3468, секвенировано более 100 изолятов ВВКК; для одних удалось определить, а для других – предсказать возможный характер их взаимодействия с растением-хозяином (томат сорта Ратджерс).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выращивание картофеля. Для поддержания коллекции изолятов ВВКК отбирали клубни картофеля с типичными симптомами виroidной инфекции, т.е. веретеновидной или грушевидной формы с выраженными глазками и трещинами. Весной их высаживали на опытном поле ВНИИФ. Через месяц после появления всходов с каждого куста собирали образцы листьев для выделения РНК. Для поддержания и воспроизведения каждого из изолятов ВВКК в конце сезона оставляли 5–7 клубней картофеля, собранных с инфицированных растений. Клубни хранили при температуре $+4\dots+6^{\circ}\text{C}$.

Выделение РНК и определение ВВКК. Суммарную РНК, выделенную из 30 мг растительной тка-

ни общепринятым методом [12], растворяли в 50 мкл стерильной воды. 1 мкл раствора РНК каждого образца наносили на нейлоновую мембрану, фиксировали ультрафиолетовым облучением и гибридизовали с ВВКК-специфичным РНК-зондом, меченным дигоксигенином (“Roche Diagnostics GmbH”, Германия) или диен-платиной [13]. О присутствии ВВКК судили по наличию окрашенного пятна.

Восстановление изолятов ВВКК, хранившихся при низкой температуре. Как указывалось выше, часть изолятов из коллекции ВНИИФ сохраняли при -20°C в виде растворов суммарной низкомолекулярной РНК. Растворы размораживали, центрифугировали и инокулировали ими растения томатов сорта Ратджерс, как описано ранее [11]. Из-за того, что РНК хранилась очень долго (десять лет), концентрацию ВВКК в таких препаратах было невозможно определить, но мы надеялись на сохранность хотя бы небольшого количества недеградированных молекул ВВКК, способных к репродукции *in vivo*. Через месяц собирали образцы верхних листьев и выделяли из них суммарную РНК.

Биотест на растениях-индикаторах. 50 мкл препарата суммарной РНК (примерная концентрация 0.5–1.0 мкг/мл) выбранного изолята ВВКК использовали для механической инокуляции семидольных листьев пяти растений томатов сорта Ратджерс [11]. Температуру в тепличном боксе поддерживали на уровне 30°C . Начиная со второй недели после инокуляции, следили за появлением симптомов. Через 30 дней после инокуляции измеряли высоту растений и отбирали образцы для выделения и секвенирования ВВКК.

ОТ-ПЦР и анализ последовательности нуклеотидов проводили так, как описано ранее [11], но вместо ДНК-полимеразы фирмы “Fermentas” (Литва) использовали Smart Taq ДНК-полимеразу фирмы “Диалат” (Москва). Нуклеотидную последовательность неклонированных и клонированных кДНК ВВКК определяли на автоматическом секвенаторе ABI Prism Genetic Analyzer 3100 (“PUNNY”, Россия).

Наименования изолятов ВВКК. Изолят маркировали по названию хозяйства, учреждения или местности, откуда получали инфицированный материал. В некоторых случаях, когда из одного места получали несколько образцов, в наименование изолята вводили название сорта картофеля, служившего растением-хозяином. Две цифры после буквенного обозначения изолята ВВКК соответствуют двум последним цифрам года начала репродукции клубней картофеля, инфицированных этим изолятом, после поступления в коллекцию ВНИИФ, или года получения образца (пробирочного растения или выделенной РНК, оставленной для хранения при низкой температуре). Цифры (или цифры и буквы) после слэша указы-

вают номер, под которым изолят числится в коллекции ВНИИФ. Две цифры, следующие за знаком “_”, — это две последние цифры в обозначении года, когда определяли последовательность. Так обозначали изоляты, которые повторно секвенировали в последующие годы. Если же изолят секвенировали не один раз в течение одного года с разным результатом, то после знака “_” следовали цифры 1, 2 или 3.

Нуклеотидные последовательности каждого секвенированного изолята ВВКК сравнивали с последовательностью типичного умеренного изолята (PSTVd.018, Acc. no. v01465), выбранного в качестве эталона, в котором каждый нуклеотид имел свой порядковый номер. Все нуклеотидные замены, вставки и делеции последовательности изолятов обозначены в соответствии с нумерацией нуклеотидов в указанном изоляте. Например, если в секвенированном изоляте вместо аденина в положении 120 стоит цитозин, это обозначали как A120C. Отсутствие аденина в положении 121 записывали как –A121, но следующий за ним нуклеотид по-прежнему имеет номер 122. Вставку урацила между нуклеотидами 141 и 142 обозначали как +U141a, т.е. делеции и вставки не влияют на порядковые номера нуклеотидов, соответствующих таковым изолята PSTVd.018.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изоляты ВВКК, поддерживаемые на картофеле

К началу 2006 г. в коллекции ВВКК ВНИИФ насчитывалось 11 изолятов ВВКК, которые с 1993–97 гг. поддерживались на картофеле. Четыре из них (Онега-Премьер-94, Нива-95, Бугры-97 и Самара-97/3) (табл. 1, №№ 1, 5, 22 и 34) секвенированы и депонированы в GenBank в 2006 г. [14]. Изоляты Онега-Премьер-94 и Бугры-97 отличаются от типичного умеренного изолята по одной делеции (–A120) и одной замене (A121U/C), что не влияет на характер их взаимодействия с растением-хозяином на уровне фенотипа: оба изолята индуцируют умеренные симптомы на томате сорта Ратджерс.

В табл. 1 представлены различия в последовательностях 38 изолятов ВВКК из коллекции ВНИИФ, поддерживаемых ежегодным воспроизводством инфицированных клубней картофеля. Все они составляют 25 вариантов последовательностей (колонка 5). Еще 30 изолятов ВВКК, из числа бывших в разные годы в составе нашей коллекции, не включены в таблицу, так как 18 из них идентичны изоляту ВНИИФ-93 (EU879915), а 12 — изоляту Бугры-97 (EF044303). Изоляты, идентичные ВВКК ВНИИФ-93, обнаружены в образцах, собранных в Центральном регионе РФ, Западной Сибири, Дальнем Востоке и Северном Кавказе. Изоляты, идентичные ВВКК Бугры-97, чаще всего встречаются в Северо-Западном реги-

оне и в Украине, но также в Поволжье и Центральном регионе.

Последовательности тринадцати коллекционных изолятов, представленных в табл. 1, депонированы в GenBank. Два изолята ВВКК — один из Кореи, обнаруженный нами в коллекции ВНИИКХ (Корея-07/65В), а другой из Грузии (Тбилиси-09/163В) — идентичны типичному умеренному изоляту (v01465). Изолят ВНИИФ-93 имел последовательность, идентичную ранее описанной последовательности изолята PSTVd.004 (Acc. No. m14814 из Германии), изолят Кинель-08/132В — изоляту из *Solanum commersonii* (Нидерланды — m25199), изолят Укр-Сокольский-08/80В_1 — изоляту из Польши (x76844). Несколько одинаковых вариантов последовательностей, включенных в табл. 1, получены из двух–трех разных источников/местностей, но другие 12 вариантов зарегистрированы лишь по одному разу. Шесть вариантов последовательностей ВВКК, из представленных в табл. 1, еще не депонированы.

Изоляты ВВКК, выделенные из меристемных растений

В 2009 и 2010 гг. мы получили несколько меристемных растений, инфицированных ВВКК, из ВНИИКХ и научных учреждений Западной Сибири для анализа последовательностей ВВКК. Отличия нуклеотидных последовательностей этих изолятов от изолята PSTVd.018 (v01465) представлены в табл. 2. Все изоляты имеют делецию аденина в положении 120 и замену аденина на цитозин в положении 121. Пять изолятов идентичны изоляту Бугры-97, остальные семь имеют последовательность, которая ранее не встречалась. Таким образом, выявлено еще семь новых вариантов (табл. 2).

Изоляты ВВКК, восстановленные из длительно хранившейся РНК

Восстановлено 24 изолята ВВКК из коллекции образцов суммарной РНК, которые хранились замороженными с 1980-х–1990-х годов. Самые старые образцы РНК датированы 1977 г. Как видно из табл. 2, последовательности одиннадцати изолятов ВВКК идентичны последовательности изолята Бугры-97. Еще четыре изолята, так же как и эти 11, имеют ту же характерную двойную мутацию (т.е. –A120, A121C) и от одной до трех дополнительных замен. У пяти изолятов аденин в положении 120 отсутствует, а аденин в положении 121 заменен на урацил (A/U), а не на цитозин (–A120, A121U). Изолят Скополия-91_08 идентичен изоляту ВНИИФ-93 (EU879915), наиболее часто встречающемуся в коллекции, который поддерживается на картофеле в полевых условиях. Еще один изолят, хранившийся в виде замороженной РНК с 1977 г. (Поволжье-77), вос-

Таблица 1. Изоляты ВВКК из коллекции ВНИИФ, поддерживаемые ежегодной репродукцией инфицированных клубней картофеля

№ пп изолята	Название изолята	Сорт картофеля	Происхождение (регион РФ или страна)	Изменения в последовательности нуклеотидов по сравнению с PSTVd.018	Асс. No.	№ пп варианта ВВКК
1*	Онега-Премьер-94	Невский	Сев.-Западный	-A120, A121U	ef044304	1
2	Томск-06/19В	Накра	Зап. Сибирь			
3	Чернигов-08/85В	Кинг Эдвард	Украина			
4	Кинель-08/138В	Неизвестный	Поволжье			
5*	Нива-95	Луговской	Сев.-Западный	-A120, A121U, +U141a	ef044302	2
6	ВНИИФ-07/D16	<i>Solanum demissum</i>	Центральный	-A120, A121U, C193U	eu879913	3
7*	ВИЗР-06/15L_09	Невский	Сев.-Западный	+U62a, -A120, A121U, A222U		4
8	ВИЗР-06/15L_10	Невский	Сев.-Западный	-A120, A121U, A222U		5
9	ВНИИФ-93	Луговской	Центральный	-A120, A121U, A310U, +U311a	eu879915 идентичен m14814	6
10*	Укр-Сокольский – 08/80В2	Сокольский	Украина	-A120, A121U, -A126, A310U, +U311a		7
11	Самара-97/2	Ресурс	Поволжье	-A120, A121U, C256U, A310U, +U311a	eu879917	8
12	Онега-94/2	Невский	Сев.-Западный			
13	Укр-Панда-08/87В_09	Панда	Украина			
14*	Укр-Панда-08/87В_10	Панда	Украина	-A120, A121U, C256A, A310U, +U311a		9
15	Кн-06/29В	Удача	Дальний Восток	-A120, A121U, U306A, A310U, +U311a	eu879918	10
16*	Укр-Сокольский-08/80В1	Сокольский	Украина	-A120, A121U, A310C, +U311a	Идентичен x76844	11
17	Кинель-08/132В	Неизвестный	Поволжье	-A120, A121U, A310C, C311U	Идентичен m25199	12
18*	Кинель-08/132В1	Неизвестный	Поволжье	-A120, A121U, U306A, A310C, C311U		13
19	ВИЗР-06/6L_07	Невский	Сев.-Западный	-A120, A121U, -A126, A142U, G143U, A219G, -C235, U309A, C311U	eu879919	14
20	ВИР-06/9L	Ресурс	Сев.-Западный			
21*	ВИР-06/5L_08,10	Невский	Сев.-Западный			
22*	Бугры-97	Луговской	Сев.-Западный	-A120, A121C	ef044303	15
23	ВИР-06/5L_07	Невский	Сев.-Западный	+U62a, -A120, A121C	eu879914	16
24*	ВИЗР-06/4L_10	Десница	Сев.-Западный			
25	ВИЗР-06/6L2_08	Невский	Сев.-Западный	G49N, A120C, -A121, C256A	eu879922	17
26	ВИЗР-06/6L_09	Невский	Сев.-Западный	-A120, A121C, A310U		18
27	ВНИИКХ-07/42М	Гибрид 2567-5	Центральный	-A120, A121C, C256A, A310U, +U311a	eu879921	19
28*	Одесса-07/73В	Неизвестный	Украина			
29*	ВИЗР-06/6L_10	Невский	Сев.-Западный	-A120, A121C, C256U		20
30*	ВНИИКХ-08/94В	Гибрид 2567-5	Центральный	-A120, A121C, C256A, +U311a		21

Таблица 1. Окончание

№ пп изолята	Название изолята	Сорт картофеля	Происхождение (регион РФ или страна)	Изменения в последовательности нуклеотидов по сравнению с PSTVd.018	Асс. No.	№ пп варианта ВВКК
31	ВНИИФ-07/К	Луговской	Центральный	-A120, A121C, A310U, +U311a	eu879920	22
32	ВНИИФ-93/4-Lug	Луговской	Центральный			
33*	Тверь-64МТ	Невский	Центральный			
34*	Самара-97/3	Кинельская Роза	Поволжье	-A120, A121C, C256U, A310U, +U311a	ef044305	23
35	ВНИИФ-93/20-Лорх	Лорх	Центральный			
36	Тверь-96	Луговской	Центральный	-A120, A121C, C256U, U306A, A310C, C311U	eu879923	24
37	ВНИИКХ-Корея-07/65В	Golden Valley	Центральный	Нет изменений	Идентичен v01465	25
38*	Тбилиси-08/163В	Неизвестный	Грузия			

* Отмечены изоляты, проверявшиеся в биотесте на томатах сорта Ратджерс (см. раздел Результаты исследования / Биотест на растениях-индикаторах).

становлен дважды и депонирован нами в GenBank в 2009 году (eu879916). По-видимому, именно этот изолят был привезен из лаборатории Р. Сингха (Канада) в 1976 г. в качестве контроля для изучения российских эндемичных изолятов ВВКК [7]. В 1993 г. он был описан Сингхом и соавт. [15], а ранее депонирован в GenBank под названием "Wisconsin B" (PSTVd.009, m88677).

Среди восстановленных изолятов три изолята ВВКК получены из Армении. Образцы листьев томатов собирали в теплицах во время экспедиции в 1980-х гг. Препараты РНК хранились с 1983, 1987 и 1991 гг. В 2008 г. изоляты восстановлены и секвенированы. Данные были подтверждены в 2009 г.

Биотест на растениях-индикаторах

Двадцать шесть изолятов ВВКК из коллекции ВНИИФ испытывали в биотесте на томате сорта Ратджерс, чтобы показать, влияет ли изменение их первичной структуры на симптомы болезни, индуцируемые на растениях. Среди изолятов было 19, имеющих одно или несколько изменений в домене, ответственном за патогенность, и семь изолятов – без каких-либо мутаций в указанной области молекулы. Всех их сравнивали с тремя стандартными штаммами ВВКК – мягким, умеренным и суровым.

Семь изолятов – ВНИИКХ-09/209m, Агата-09/184m, Грация-97, Канада-87, Армения-91 (табл. 2, №№ 6, 11, 32, 33 и 36 соответственно), ВИЗР-06/15L_09 и ВИЗР-06/4L_10 (табл. 1, №№ 7 и 24) – при инфицировании ими томатов обнаружили свойства, соответствующие суровым штаммам. Изоляты Армения-83 и Армения-87

(табл. 2, №№ 34 и 35) проявляют себя и как умеренные, и как суровые, два изолята (Укр-Панда-08/87В_10 и Кинель-08/132В1, табл. 1, №№ 14 и 18) обладают свойствами умеренного штамма, а восемь (Укр-Сокольский-08/80В2, Укр-Сокольский-08/80В1, ВИР-06/5L_10, Одесса-07/73В, ВНИИКХ-08/94В, Тверь-64МТ, Самара-97/3, табл. 1, №№ 10, 16, 21, 28, 30, 33, 34) и ЮАЛ-79_10, табл. 2, № 25) сходны с типичным мягким штаммом.

Из испытанных в биотесте семи изолятов ВВКК, не имеющих мутаций в домене, ответственном за патогенность, изолят Тбилиси-08/163 (табл. 1, № 38) идентичен типичному умеренному штамму, изоляты Онега-Премьер-94 и Бугры-97 (табл. 1, №№ 1 и 22) содержат замены на границе центрального и варибельного доменов (-A120, A121U/C). В дополнение к этим двум мутациям, изолят Нива-95 (табл. 1, № 5) имеет вставку +U141a в варибельном домене, а изолят ВИЗР-06/6L_10 (табл. 1, № 29) – замену C256U на периферии петли E. Все пять описанных изолятов индуцировали умеренные симптомы болезни на томате.

Два других изолята ВВКК (ВНИИКХ-09/205m и ВНИИКХ-94/2_08,10, табл. 2, №№ 7 и 24), помимо нейтральных мутаций в положениях 120 и 121, содержат замены в петле E, а именно: первый – замену U257A, второй – C256A. Результатом мутации U257A являются ярко выраженные типичные суровые симптомы (морщинистость, скручивание листьев, карликовость) и характерный для этой мутации симптом "плоской верхушки" [16]. Замена C256A приводит к более выраженным симптомам болезни у умеренного штамма, хотя, как и

Таблица 2. Секвенированные изоляты ВВКК, выделенные из меристемных растений картофеля (№ 1–12) или восстановленные после длительного хранения РНК при –20°C (№ 13–36)

№ пп изолята	Название изолята	Сорт картофеля	Происхождение (регион РФ или страна)	Изменения в последовательности нуклеотидов по сравнению с PSTVd.018	№ пп варианта
1	ЗС-Систра-10/186m	Систра	Зап. Сибирь	–A120, A121C	Идентичен ef044303 (см. табл.1, № 22)
2	ВНИИКХ-09/206m	Голубизна	Центральный		
3	ВНИИКХ-09/207m	Заворовский	Центральный		
4	ВНИИКХ-09/208m	Сотка	Центральный		
5	ВНИИКХ-09/212m	Сказка	Центральный		
6*	ВНИИКХ-09/209m	Бронницкий-200	Центральный	+A51a, +U62a, –A120, A121C, +U147a, C214U, –C311, U312C, +C318a	26
7*	ВНИИКХ-09/205m	Москворецкий-13	Центральный	–A120, A121C, U257A	27
8	ЗС-Бор-10/232m,	Бор	Зап. Сибирь	–A120, A121C, A310C, C311U	28
9	ЗС-Седов-10/233m	Седов	Зап. Сибирь	–A120, A121C, C256U, A310C, C311U	29
10	ЗС-Жуковский-10/235m	Жуковский	Зап. Сибирь	–A120, A121C, U306A, A310C, C311U	30
11*	ЗС-Агата-09/184m	Агата	Зап. Сибирь	+A51a, –A120, A121C, +C147a, A310C, C311U	31
12	ЗС-Удача-10/228m	Удача	Зап. Сибирь	+A51a, –A120, A121C, +C147a, C259U, A310C, C311U	32
13	Раменка-93_09	Неизвестный	Центральный	–A120, A121C	Идентичен ef044303 (см. табл.1, № 22)
14	Фито-Тех-93_09	Неизвестный	Центральный		
15	ДВ-94_08	Невский	Дальний Восток		
16	ВНИИКХ-94/1_07	Неизвестный	Центральный		
17	Скополия-95_09	Скополия	Центральный		
18	Брянск-95_08	Неизвестный	Центральный		
19	Пенза-96_07	Свитанок	Поволжье		
20	РНК-смесь-96_09				
21	Тверь-97_07	Луговской	Центральный		
22	С.-Петербург-98_09	Невский	Сев.-Западный		
23	РНК-смесь-98_08				
24*	ВНИИКХ-94/2_08,10	Неизвестный	Центральный	–A120, A121C, C256A	33
25*	ЮАЛ-79_10	Лорх	Поволжье	–A120, A121C, C256A, U309A, C311U	34
26	ЮАЛ-79_09_1	Лорх	Поволжье	–A120, A121C, C256A, –U309, C311U	35
27	ЮАЛ-79_09_2	Лорх	Поволжье	–A120, A121C, C256U, U309A, C311U	36
28	Скополия-91_08	Скополия	Центральный	–A120, A121U, A310U, +U311a	Идентичен eu879915 (см. табл.1, № 9)
29	Поволжье-77_08	Лорх	Канада (Singh,1977?)	–A120, A121U, G254A, A310U, +U311a	37 eu879916 идентичен m88677
30	РНК-смесь-77-84-92				

Таблица 2. Окончание

№ пп изолята	Название изолята	Сорт картофеля	Происхождение (регион РФ или страна)	Изменения в последовательности нуклеотидов по сравнению с PSTVd.018	№ пп варианта
31	ДВ-91_08, 09	Пауль Вагнер	Дальний Восток	–A120, A121U, A222U, A310U, +U311a	38
32*	Грация-97_08,09	Грация	Центральный	+A51a, –A120, A121U, –A126, +U141a, –C235, A310C, C311U	39
33*	Канада-87_10	Неизвестный	Неизвестно	G46A, –A120, A121U, –U313, C315U, U316C, +C318a	40
34*	Армения-83_08,09	Томаты	Армения	+U62a, +U141a, –U309, C311U, +C318a	41
35*	Армения-87_08,09	Томаты	Армения	+A60a,b, +U62a, –A126, +U141a, +U305a,b, –U309, C311U, +C318a	42
36*	Армения-91_08,09	Томаты	Армения	G49A, +U62a, +U141a, –A310, +C318a	43 идентичен m88678

* Отмечены изоляты, проверявшиеся в биотесте на томатах сорта Ратджерс (см. раздел Результаты исследования / Биотест на растениях-индикаторах).

отмечалось ранее [17], не влияет на симптоматику у мягких штаммов ВВКК.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Более ста изолятов ВВКК секвенировали в период между 2006 и 2011 гг. В настоящей работе приведена характеристика ста четырех природных изолятов. Большая часть из них, а именно 68, – это изоляты, поддерживаемые на клубнях картофеля, которые выращивались в полевых условиях. Все они образуют 25 вариантов последовательностей, отличающихся одна от другой, причем 15 вариантов соответствуют 15 изолятам, т.е. встречаются только один раз, тогда как 10 последовательностей – от 2 до 20 раз среди остальных пятидесяти трех изолятов ВВКК. Мы поддерживали разные варианты ВВКК, поэтому для воспроизводства оставляли не более одного, двух или трех изолятов с идентичной первичной структурой (вариантов). Поскольку некоторые изоляты утрачивались в процессе хранения и выращивания, к настоящему времени такая “живая” коллекция насчитывает примерно 20 вариантов ВВКК. Многие изоляты хранятся в виде РНК при низкой температуре (–20°C или –70°C), другие – в виде клонированной кДНК.

Кроме двух вариантов последовательностей, которые уже встречались у изолятов ВВКК, поддерживаемых на картофеле (ef044303 и eu879915), среди изолятов ВВКК, выделенных из пробирочных меристемных растений, и изолятов, восстановленных из суммарной РНК, хранившейся длительное время при низкой температуре (табл. 2), обнаружили 18 новых вариантов последовательностей, из которых 16 ранее не описаны.

Таким образом, в коллекции ВНИИФ на протяжении нескольких лет собрано более ста изолятов ВВКК, представленных сорока тремя (43) вариантами последовательностей (табл. 1, колонка 7 и табл. 2, колонка 6).

В табл. 3 приведены данные по всем мутациям, которые имеются у сорока трех вариантов ВВКК, встречавшихся в коллекции ВНИИФ. Данные отсортированы по частоте встречаемости мутаций в порядке убывания. Наиболее часто встречается делеция аденина на участке A118...A123 (97.5%). Эта мутация (обозначена как –A120) всегда сопряжена с заменой одного из аденинов на том же участке на урацил (45.5% вариантов) или на цитозин (52.5%). Эти мутации нейтральны, поскольку не приводят к заметным изменениям характера взаимодействия патогена с растением-хозяином (томатом сорта Ратджерс). В Международной базе данных изоляты с мутацией –A120 встречаются нередко; как правило, они содержат замену A121U, но есть и изоляты только с делецией A120. Что касается замены A120C, то изолятов с такой мутацией до 2011 г. не обнаруживали где-либо за пределами бывшего СССР (России и Украины). В нашей же коллекции они составляют более 50%.

Если принять во внимание не показанную здесь группу из двадцати изолятов, идентичных PSTVd.004 (m14814), то четвертое и пятое место по частоте занимают встречающиеся почти всегда вместе две мутации: вставка +U311a (30% вариантов) и замена A310U (27.5% изолятов). Впервые изолят с такими мутациями секвенировали в Германии, это типичный представитель “мягкого” штамма ВВКК. Обе мутации приходятся на домен, ответственный за патогенность. Их появле-

Таблица 3. Частота встречаемости мутаций у сорока трех вариантов последовательностей ВВКК из коллекции ВНИИФ

№ пп	Мутация	Число	Встречаемость, %	№ пп	Мутация	Число	Встречаемость, %
1	–A120	39	97.5	21	A142U	2	5.0
2	A121U	18	45.0	22	G143U	2	5.0
3	A121C	21	52.5	23	A219G	2	5.0
4	+U311a	12	30.0	24	A222U	2	5.0
5	A310U	11	27.5	25	–U313	1	2.5
6	C311U	15	37.5	26	G49A	1	2.5
7	A310C	10	25.0	27	–A310	1	2.5
8	+U62a	6	15.0	28	C315U	1	2.5
9	C256A	7	17.5	29	U316C	1	2.5
10	C256U	6	15.0	30	G49N	1	2.5
11	+C318a	5	12.5	31	+A60a,b	1	2.5
12	+U141a	5	12.5	32	A126U	1	2.5
13	+A51a	4	10.0	33	+U147a	1	2.5
14	–A126	3	7.5	34	C193U	1	2.5
15	G46A	1	2.5	35	C214U	1	2.5
16	U309A	4	10.0	36	G254A	1	2.5
17	–U309	3	7.5	37	U257A	1	2.5
18	–C235	3	7.5	38	C259U	1	2.5
19	U306A	3	7.5	39	–C311	1	2.5
20	+C147a	2	5.0	40	U312C	1	2.5

ние приводит к тому, что участок РНК с шестью спаренными основаниями и двумя неспаренными (позиции 310...317) превращается в более упорядоченную структуру с восемью спаренными основаниями и одним неспаренным, что кардинально влияет на взаимоотношения с растением-хозяином: штамм из умеренного превращается в мягкий. Идентичный изолят из нашей коллекции – ВНИИФ-93 – также депонирован в GenBank (EU879915).

Еще одна распространенная мутация – замена C311U (37.5%) – приводит к образованию дополнительных водородных связей в домене, ответственном за патогенность. Часто она сопровождается заменой A310C (25% вариантов последовательностей), но иногда первая мутация наблюдается отдельно от последней (12.5% случаев). Вставка +U62a должна ослаблять связи между основаниями в домене, ответственном за патогенность; и действительно, изоляты, имеющие такую мутацию, индуцируют на томате суровые симптомы болезни. Аналогичное действие оказывает вставка +A51a.

Меньшую, но довольно значительную долю из мутаций российских изолятов занимают мутации на периферии петли E – C256U и C256A (15 и 17.5% соответственно). Первая мутация имеет нейтральный характер (изоляты ВИЗР-06/6L_10

и Самара-97/3), мутация C256A у ожидаемо умеренного штамма (изолят ВНИИКХ-94/2_08,10) сопровождается суровыми симптомами, а у мягких штаммов (изолят Одесса-07/73В и ВНИИКХ-08/94В – табл. 1, №№ 28 и 30) – нейтральна. О нейтральном характере мутации C256A у мягкого штамма ВВКК ранее сообщали Оуэнс (Owens) и соавт. [17].

Особый интерес представляют две единичные мутации в петле E, которые обнаружены у российских изолятов. Замена U257A (изолят ВНИИКХ-09/205m) превращает умеренный штамм в суровый, что соответствует результатам, опубликованным ранее [16]. Хотя функциональный эффект мутации C259U у изолята ЗС-Удача-10/228m (табл. 2, № 12) мы не исследовали, но другие авторы показали, что такая мутация позволяет ВВКК реплицироваться в табаке (*Nicotiana tabacum*) [18].

С филогенетической и таксономической точки зрения наши данные дают основание предполагать, что наличие или отсутствие мутаций на участке A118...A123 можно использовать в качестве признака для дифференциации природных изолятов ВВКК. Все имеющиеся в базе данных ВВКК по этому признаку можно разделить на четыре группы (популяции). Три изолята (PSTVd.018, PSTVd.123 и PSTVd.125) выступают в качестве группо-образующих, а все другие внутри

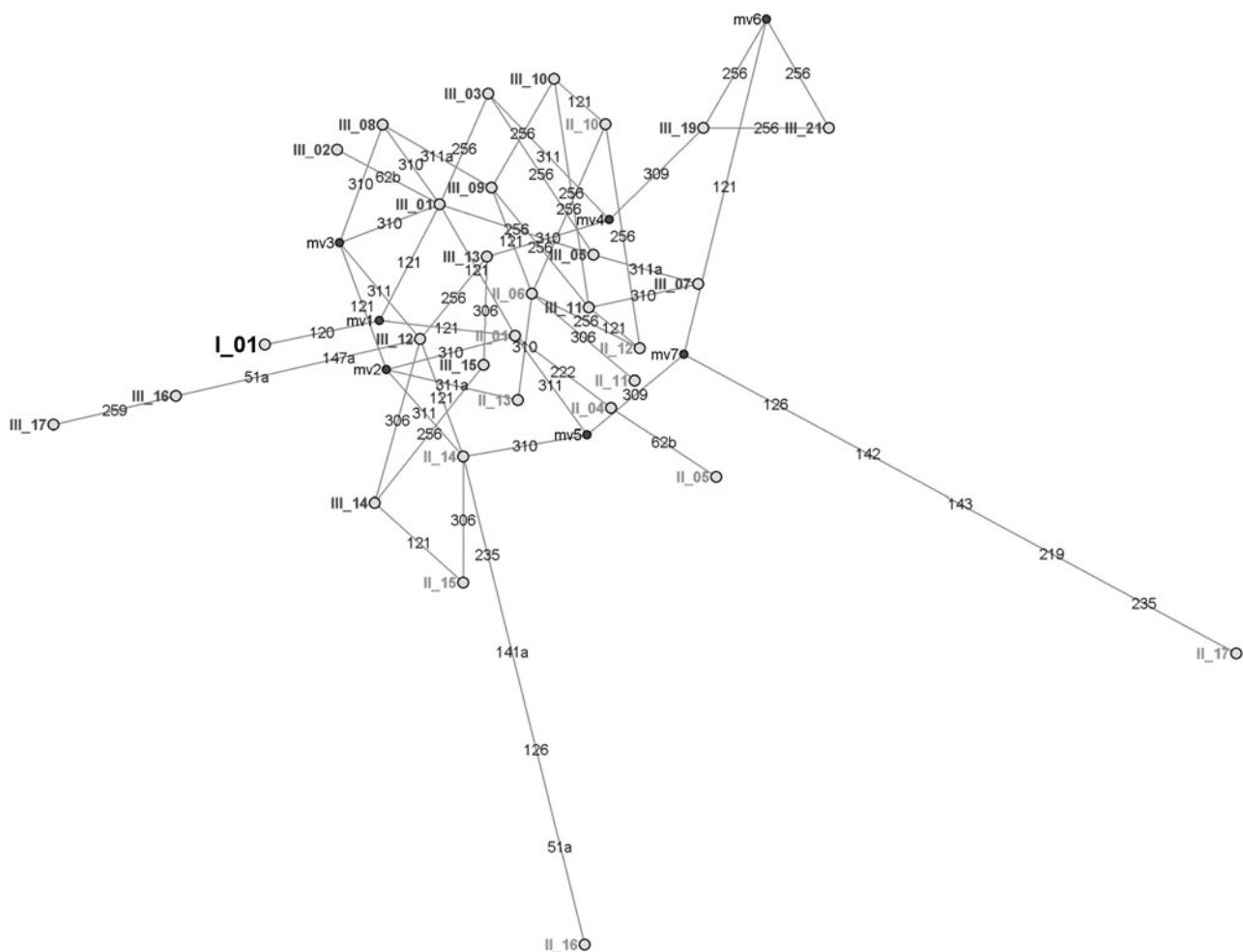


Рис. 2. Филогенетические связи между изолятами ВВКК из коллекции ВНИИФ (Fluxus network analysis). Обозначения изолятов, представленных на схеме, показаны в табл. 4; цифры на линиях – позиции в молекуле ВВКК, где произошла мутация; mv – гипотетический изолят, который может рассматриваться в качестве промежуточного между существующими изолятами.

этих трех групп рассматриваются как их производные.

1. Группа PSTVd.018 (v01465). Нуклеотидная последовательность изолята PSTVd.018 наиболее универсальна. Из нее может быть образована последовательность любого другого природного изолята ВВКК при наименьшем числе мутаций, поэтому она может рассматриваться в качестве “родоначальной” для изолятов своей группы и даже других групп. Изоляты этой группы имеют пять или шесть остатков аденина в положении 118–123. В настоящее время к этой группе можно отнести свыше шестидесяти природных вариантов последовательностей ВВКК из GenBank и несколько вариантов, описанных ранее [19], но еще не депонированных. Из них более тридцати последовательностей ВВКК декоративных культур семейства *Solanaceae* можно выделить в отдельную подгруппу, поскольку они близкородственны. Четыре варианта последовательностей из коллекции

ВНИИФ также принадлежат к этой группе, но только два (Армения-83 и Армения-87) не имеют идентичных в базе данных.

2. Группа PSTVd.123 (ef044304). Как указано выше, изолят PSTVd.123 отличается от изолята PSTVd.018 только по двум мутациям (–A120 и A121U). Эта группа содержит более сорока вариантов из базы данных, девять из них – российские. Еще восемь российских вариантов этой группы пока не депонированы в GenBank. Депонированные в базе данных 16 вариантов ВВКК декоративных культур семейства *Solanaceae* можно рассматривать как подгруппу этой группы ВВКК.

3. Группа PSTVd.125 (ef044303) тесно связана с группой PSTVd.123. У всех изолятов отсутствует один аденин из шести между A118 и A123, а второй аденин на том же участке заменен на цитозин. Группа включает 21 вариант последовательностей, обнаруженных в России и Украине, семь

Таблица 4. Обозначение вариантов последовательностей ВВКК из коллекции ВНИИФ, использованных в филогенетическом анализе

№ пп.	Обозначение	Название изолята или Асс. по.	Изменения в последовательности нуклеотидов по сравнению с PSTVd.018
1	I_01*	018_PSTVd_Inter	
2	I_02	Армения-91=008_M88678	G49A, +U62a, +U141a, -A310, +C318a
3	I_03	Армения-83	+U62a, +U141a, -U309, C311U, +C318a
4	I_04	Армения-87	+A60a,b, +U62a, -A126, +U141a, +U305a,b, -U309, C311U, +C318a
5	II_01*	123_EF044304	-A120, A121U
6	II_02	124_EF044302	-A120, A121U, +U141a
7	II_03	EU879913	-A120, A121U, C193U
8	II_04*	ВИЗР-06/15L_10	-A120, A121U, A222U
9	II_05*	ВИЗР-06/15L_09	+U62a, -A120, A121U, A222U
10	II_06*	EU879915=004_M14814	-A120, A121U, A310U, +U311a
11	II_07	Сокольский-08/80B2_10	-A120, A121U, -A126, A310U, +U311a
12	II_08	DV-91_08_09	-A120, A121U, A222U, A310U, +U311a
13	II_09	EU879916=009_M88677	-A120, A121U, G254A, A310U, +U311a
14	II_10*	EU879917	-A120, A121U, C256U, A310U, +U311a
15	II_11*	EU879918	-A120, A121U, U306A, A310U, +U311a
16	II_12*	Укр-Панда-08/87B_10	-A120, A121U, C256A, A310U, +U311a
17	II_13*	Сокольский-08/80B=021_X76844	-A120, A121U, A310C, +U311a
18	II_14*	Кинель-08/132B=005_M25199	-A120, A121U, A310C, C311U
19	II_15*	Кинель-08/132B1	-A120, A121U, U306A, A310C, C311U,
20	II_16*	Грация-97	+A51a, -A120, A121U, -A126, +U141a, -C235, A310C, C311U
21	II_17*	EU879919	-A120, A121U, -A126, A142U, G143U, A219G, -C235, U309A, C311U
22	II_18	Канада-87_10	G46A, -A120, A121U, -U313, C315U, U316C, +C318a
23	III_01*	125_EF044303	-A120, A121C
24	III_02*	EU879914	+U62a, -A120, A121C
25	III_03*	ВИЗР-06/6L_10	-A120, A121C, C256U
26	III_04	ВНИИКХ-09/205m	-A120, A121C, U257A
27	III_05*	ВНИИКХ-94/2_08_09	-A120, A121C, C256A
28	III_06	EU879922	G49N, A120C, -A121, C256A
29	III_07*	ВНИИКХ-08/94B	-A120, A121C, C256A, +U311a
30	III_08*	ВИЗР-06/6L_09	-A120, A121C, A310U
31	III_09*	EU879920	-A120, A121C, A310U, +U311a
32	III_10*	122_EF044305	-A120, A121C, C256U, A310U, +U311a
33	III_11*	EU879921	-A120, A121C, C256A, A310U, +U311a
34	III_12*	ЗС_Бор-10/232m	-A120, A121C, A310C, C311U
35	III_13*	ЗС-Седов-10/233m	-A120, A121C, C256U, A310C, C311U
36	III_14*	ЗС-Жуковский-10/235m	-A120, A121C, U306A, A310C, C311U
37	III_15*	EU879923	-A120, A121C, C256U, U306A, A310C, C311U
38	III_16*	Агата-09/184m	+A51a, -A120, A121C, +C147a, A310C, C311U
39	III_17*	ЗС-Удача-10/228m	+A51a, -A120, A121C, +C147a, C259U, A310C, C311U
40	III_18	ВНИИКХ-09/209m	+A51a, +U62a, -A120, A121C, +U147a, C214U, -C311, U312C, +C318a
41	III_19*	ЮАЛ-79_09_2	-A120, A121C, C256U, U309A, C311U
42	III_20	ЮАЛ-79_09_1	-A120, A121C, C256A, U309, C311U
43	III_21*	ЮАЛ-79_10_3	-A120, A121C, C256A, -U309A, C311U

* Отмечены изоляты ВВКК из коллекции ВНИИФ, которые включены в филогенетический анализ, представленный на рис. 2.

из которых депонированы в GenBank. Два изолята из Индии (hq639697 и hq639701), также принадлежащие к этой группе, депонированы в 2011 г. У изолятов из групп PSTVd.123 и PSTVd.125 много идентичных мутаций.

4. Большинство изолятов этой группы происходит из Новой Зеландии или Австралии, они ин-

фицируют различные растения из семейства пасленовых (томат, перец, физалис, картофель и другие). В GenBank депонировано десять вариантов этой группы, и все они значительно отличаются от других природных изолятов ВВКК. По сравнению сPSTVd.018, для них характерно отсутствие двух адениновых остатков между A118 и A123 и

одиннадцать общих для всех мутаций (A126C, C141U, A142C, C164U, C167U, G201U, C223U, U240, A310G, U313G, C315U). Гипотетический изолят, включающий перечисленные 13 мутаций (и только их) мог бы считаться исходным для этой группы, но он пока не обнаружен. Кроме этих мутаций, каждый изолят имеет дополнительно от семи до девяти других мутаций, большинство из которых также являются общими для этой группы.

Внутри каждой из описанных выше групп ВВКК есть мутации, характерные именно для этой группы, тогда как другие мутации встречаются в разных группах. Так, двойная мутация A310U, +U311a обычна и для изолятов групп PSTVd.123 (ef044304) и PSTVd.125 (ef044303), но не встречается в природных изолятах группы PSTVd.018 (V01465). Все изоляты декоративных культур семейства пасленовых, независимо от групповой принадлежности, имеют две мутации: +U63a и A310C, но другие две—четыре мутации — группоспецифичны.

На рис. 2 представлены филогенетические связи изолятов ВВКК из коллекции ВНИИФ между собой и с PSTVd.018. Для простоты в схему включены только те изоляты, относящиеся к группам 2 и 3, которые имеют сходные сочетания мутаций. В табл. 4 содержится расшифровка обозначений вариантов последовательностей ВВКК, включенных в схему.

Выражаем благодарность Д.З. Богоутдинову, О.А. Кондаковой, Н.М. Коняевой, К.А. Кроминой и И.В. Шмыгле за помощь на разных этапах этой работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Martin W.H. 1922. 'Spindle tuber', a new potato trouble. Hints to Potato Growers. *N. J. State Potato Assoc.* **3**, No. 8.
- Diener T.O. 1971. Potato spindle tuber 'virus' IV. A replicating, low molecular weight RNA. *Virology*. **45**, 411–428.
- Keese P., Symons R.H. 1985. Domain in viroids: evidence of intermolecular rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **82**, 4582–4586.
- Gross H.J., Domdey H., Lossow C., Jank P., Raba M., Alberty H., Sanger H.-L. 1978. Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature*. **273**, 203–208.
- Терещенко О. И. 1937. Нова хвороба картоплі. *Сад та город*. № 10, 13–17.
- Леонтьева Ю.А. 1977. О штаммах вируса (вириода) веретеновидности клубней картофеля. В: *Штаммы вирусов растений*. Владивосток, 180–187.
- Можаяева К.А., Васильева Т.Я., Налевина Т.Н. 1978. Сравнительное изучение возбудителей веретеновидности клубней картофеля из Поволжья и Канады. В: *Вирусные болезни сельскохозяйственных растений и меры борьбы с ними*. М, ВАСХНИЛ. Ч. 1. 116–117.
- Zhong X.-H., Leontis N., Qian S.-M., Itaya A., Qi Y.-J., Boris-Lawrie K., Ding B. 2006. Tertiary structural and functional analyses of a viroid RNA motif by isostericity matrix and mutagenesis reveal its essential role in replication. *J. Virol.* **80**, 8566–8581.
- Кастальева Т.Б., Можаяева К.А., Писецкая Н.Ф., Романова С.А., Трофимец Л.Н. 1992. Вириод веретеновидности клубней и оздоровление картофеля. *Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук*. **3**, 22–24.
- Можаяева К.А., Мейлдрайс Я.А., Друка А.Я., Кастальева Т.Б., Васильева Т.Я. 1989. Сравнительное изучение разных методов диагностики вириода веретеновидности клубней картофеля. *Биологические науки*. **7**, 104–110.
- Owens R.A., Girsova N.V., Kromina K.A., Lee I.-M., Mozhaeva K.A., Kastalyeva T.B. Russian isolates of *Potato spindle tuber viroid* exhibit low sequence diversity. 2009. *Plant Disease*. **93**, 752–759.
- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159.
- Дрыгин Ю.Ф., Мусин С.М., Кондакова О.А., Савенков Е.И., Соломатин С.В., Можаяева К.А., Атабеков И.Г. 1996. Молекулярная диагностика зараженности оздоровленных сортообразцов картофеля вириодом веретеновидности клубней картофеля. *Доклады РАСХН*. **6**, 24–25.
- Kastalyeva T., Mozhaeva K., Thompson S.M., Clark J., Owens R.A. 2007. Recovery of four novel *Potato spindle tuber viroid* sequence variants from Russian seed potatoes. *Plant Disease*. **91**, 469.
- Singh R.P., Singh M., Boucher A., Owens R.A. 1993. A mild strain of *Potato spindle tuber viroid* is similar to North American isolates. *Can. J. Plant Pathol.* **15**, 134–138.
- Qi Y., Ding B. 2003. Inhibition of cell growth and shoot development by a specific nucleotide sequence in a noncoding viroid RNA. *The Plant Cell*. **15**, 1360–1374.
- Owens R.A., Khurana S.M.P., Smith D.R., Singh M.N., Garg I.D. 1992. A new mild strain of *Potato spindle tuber viroid* isolated from wild *Solanum* spp. in India. *Plant Disease*. **76**, 527–529.
- Wassenegger M., Spieker R.L., Thalmeir S., Gast F.-U., Riedel L., Sanger H.L. 1996. A single nucleotide substitution converts *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) from a noninfectious to an infectious RNA for *Nicotiana tabacum*. *Virology*. **226**, 191–197.
- Verhoeven J.Th.J., Jansen C.C.C., Botermans M., Roenhorst J.W. 2010. Epidemiological evidence that vegetatively propagated, solanaceous plant species act as sources of *Potato spindle tuber viroid* inoculum for tomato. *Plant Pathol.* **59**, 3–12.