

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ ВОДНЫХ И ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ
Дальневосточного отделения РАН

Российская конференция с международным участием
РЕГИОНЫ НОВОГО ОСВОЕНИЯ:
ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ ИЗУЧЕНИЯ И
СОХРАНЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО И ЛАНДШАФТНОГО
РАЗНООБРАЗИЯ

15-18 октября 2012 г.

г. Хабаровск

Сборник докладов

УДК 502.7:582(571.6); 591(571.62)

Конференция с международным участием «Регионы нового освоения: теоретические и практические вопросы изучения и сохранения биологического и ландшафтного разнообразия», 15-18 окт. 2012 г., Хабаровск: сб. докладов [Электронный ресурс] - Хабаровск: ИВЭП ДВО РАН, 2012. - 390 с.; объем 16 Мб; 1 опт. компакт-диск (CD-ROM).

ISBN 978-5-88570-337-6

Приведены материалы, раскрывающие теоретические практические основы изучения и сохранения биологического разнообразия популяционно-видового, экосистемного и биосферного уровней наземных и водных экосистем. Рассмотрены основные экологические факторы, определяющие условия существования организмов в специфических природных условиях дальневосточного региона, даются научные основы охраны природной среды и оптимизации ООПТ.

Сборник предназначен для широкого круга специалистов-исследователей в области видового и экосистемного разнообразия, рационального природопользования, работников заповедников, учителей, преподавателей вузов, аспирантов и студентов биологических специальностей.

Ключевые слова: биоразнообразии растительного и животного мира, флора, реобиом, ландшафтное разнообразие, особо охраняемые территории, пирогенез, болотные экосистемы, микромицеты.

Редакционная коллегия: коллегия: член-корр. РАН Б.А. Воронов (ответственный редактор).
Члены редколлегии: д.г.н. А. Н. Махинов; д.б.н. С.Д. Шлотгауэр; д.б.н. Н. А. Рябинин.

Материалы конференции напечатаны в авторской редакции

ISBN 978-5-88570-337-6

© ИВЭП ДВО РАН, 2012

INSTITUTE OF WATER AND ECOLOGY PROBLEMS
Far Eastern Branch, RAS

Russian Conference with International Participation
REGIONS OF NEW DEVELOPMENT:
THEORETICAL AND PRACTICAL ASPECTS OF STUDIES AND
CONSERVATION OF BIOLOGICAL AND LANDSCAPE DIVERSITY

October, 15-18, 2012
Khabarovsk

Conference Proceedings

UDC 502.7:582(571.6); 591(571.62)

Conference with International Participation «Regions of New Development: Theoretical and Practical Aspects of Studies and Conservation of Biological and Landscape Diversity», Oct. 15-18, 2012, Khabarovsk: Conf. Proc. [electronic resource] - Khabarovsk: IWEP FEB RAS, 2012. - 390 p.; content 16 Mb; 1 opt. Compact disc (CD-ROM).

ISBN 978-5-88570-337-6

Selected materials clarify theoretical and practical aspects of studies and conservation of biological diversity of population-species, ecosystem and biosphere levels of land and water ecosystems, as well as discuss main ecological factors that determine organism existence in specific-natural conditions of the Far Eastern region. Scientific guidelines for natural environment conservation and optimization of special protected areas are recommended.

Will be of interest to various researchers and experts in species and ecosystem diversity, rational natural resource use, natural reserves, as well as lecturers, teachers, post graduates and students of biology.

Key Words: flora and fauna biodiversity, flora, rheobiom, landscape diversity, special protected areas, pyrogenesis, wetland ecosystems, micromycets.

Editorial Board: B.A. Voronov, RAS Corresponding Member (executive editor),
Members: A. N. Makhinov, Dr. Geogr.; S.D. Shlotgauer, Dr. Biol.; N. A. Ryabinin, Dr. Biol.

Conference Proceedings are published as authors' addition

ISBN 978-5-88570-337-6

© IWEP FEB RAS, 2012

ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРОИДА ВЕРЕТЕНОВИДНОСТИ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ (ВВКК) В КОЛЛЕКЦИИ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ БИОЛОГО-ПОЧВЕННОГО ИНСТИТУТА ДВО РАН

Гафицкая И.В.
Биолого-почвенный институт ДВО РАН

INVESTIGATION OF POTATO SPINDLE TUBER VIROID (PSTVd) IN THE *SOLANUM TUBEROSUM* L. COLLECTION OF THE INSTITUTE OF BIOLOGY AND SOIL SCIENCE, FEB RAS

Gafitskaya Irina V.
Institute of Biology and Soil Science FEB RAS

Potato spindle tuber viroid (PSTVd) is the causative agent of one of the most serious plant diseases while PSTVd low concentration is the main difficulty in it diagnosing. Collection from the Institute of Biology and Soil Science was analysed for PSTVd infection. At low temperatures PSTVd was detected in a few samples where perhaps viroid accumulation was increased. At the same time, increasing of temperature gave the positive result in samples where previously viroid was not found. As a result the collection has been cleared from viroid infection which helps to form the basis for the collection monitoring and to develop the methods for clearing the initial material from PSTVd.

Система безвирусного семеноводства, основывающаяся на технологии оздоровления и ускоренного размножения полученного семенного материала в условиях, исключающих повторное заражение, успешно решает многие проблемы семеноводства картофеля. Однако объектом мониторинга при этом является ограниченный набор патогенов, имеющих наибольшее хозяйственное значение в определенный временной интервал, что приводит к уязвимости семеноводства появлению новых патогенов или изменении патогенных свойств ранее известных. Картофель может поражаться несколькими виридами, но наиболее опасным является вириод веретеновидности клубней картофеля (ВВКК) [1]. Вириод – низкомолекулярная кольцевая РНК без белковой оболочки, распространяется механическим путем, с помощью насекомых, с пылью, семенами [4]. Высокие температуры стимулируют размножение ВВКК и проявление симптомов, а низкие сохраняют инфицированность растений на одном уровне. Такие свойства ВВКК способствуют его сохранению и распространению при оздоровлении картофеля [4]. При репродукции растений, зараженных ВВКК, либо иными патогенами, происходит прогрессивное накопление вириода, а также вирусных, грибных, бактериальных и микоплазменных патогенов, что ведет к одной из основных проблем при выращивании картофеля – вырождению сорта. Сорт с течением времени теряет продуктивность (на 70-90% сокращается урожайность) [1]. Снижение продуктивности под влиянием ВВКК происходит за счет уменьшения массы одного клубня и их количества, при этом падает и качество продукции. Изменения затрагивают и все растение в целом: в фазу цветения растения характеризуются готичностью (устремленность вверх), при этом имеют прямостоячие малоколенчатые немногочисленные стебли со слабым развитием боковых побегов, листьями меньшей длины, ширины и рассеченности. После цветения растения светлеют (до хлороза). Клубни образуются позже, чем у здоровых растений, и их число меньше. Клубням свойственна удлинённая, цилиндрическая или грушевидная форма с соском у основания. Кожура клубней гладкая, число глазков и чечевичек увеличено.

Глазки выпуклые с ярко выраженными “бровями”[3]. Степень угнетения роста растений зависит от штамма ВВКК, погодных условий и сорта картофеля[1]. Признаки заболевания не всегда проявляются и на ботве, и на клубнях [4]. В целом вироиды вызывают значительные изменения метаболизма, приводящие к нарушениям роста и развития, однако механизм вироид-индуцированной патологии пока не известен [3]. Для вироида наиболее характерен механический способ передачи инфекции. Патоген внедряется через поврежденные участки на поверхности растений, а затем распространяется и накапливается в разных органах и тканях. В первый и второй год после механического заражения листьев картофеля ВВКК симптомы вироидного поражения на клубнях, как правило, не обнаруживаются [4]. Однако клубни, не имеющие симптомов заболевания ВВКК, могут быть носителями вироидной инфекции, что обеспечит сохранение и распространение патогена. Таким образом, выбраковка больных растений только на основе визуального метода диагностики не может быть эффективной [1]. Необходимы новые методы диагностики ВВКК.

В качестве основного приема оздоровления картофеля применяют метод культуры апикальной меристемы. Возможность оздоровления растений *in vitro* основана на существовании градиента концентрации вируса в растущих тканях растений, при этом концентрация уменьшается по направлению к верхушке, и клетки конуса нарастания должны быть безвирусными [4]. Поддерживать изолированную меристему можно только в культуре *in vitro*. Повторяя многократно выделение меристем, можно полностью избавиться от вирусов. Эта технология является дорогостоящей, но окупается увеличением урожая. При этом в случае 100%-ной инфицированности какого-либо сорта и невозможности отбора здоровых клонов среди полевого материала этот метод является единственным [4], что приводит к уязвимости семеноводства при появлении новых патогенов. Метод культуры апикальной меристемы эффективен против вирусных, грибных, бактериальных инфекций, но при заражении вироидом он не дает результатов, поскольку визуально в культуре *in vitro* инфицированные ВВКК растения ничем не отличаются от здоровых. Длительное существование вироида в латентной форме в культивируемых *in vitro* растениях без видимых проявлений заболевания пока трудно поддается объяснению. Особенно большую опасность представляет вироид при ускоренных биотехнологических способах размножения, так как в случае зараженности исходного растения из генного банка все 100% размноженных микрочеренкованием растений будут больными [3]. Поэтому особенно актуальным является тщательный контроль состояния исходного материала.

Для диагностики качества материала используют несколько методов. Например, ВВКК-использование растений-индикаторов (томаты сорта “Rutgers” и скополия *Scopolia sinensis*), возвратный электрофорез (R-PAGE) в полиакриламидном геле, ДНК-гибридизационные тесты (NAS) с радиактивной и диенплатиновой меткой. Индикаторные методы не всегда визуализуют мягкие штаммы ВВКК; NAS, R-PAGE методы трудоемки и требуют больших временных затрат; при этом метод обратной транскрипции полимеразной цепной реакции (RT-PCR, ОТ-ПЦР) известен как быстрый и высокочувствительный метод для детекции вироида [3]. Методом ПЦР можно размножить 1 молекулу вироида в сто миллионов раз после 27 циклов размножения, т.е. диагностика методом ПЦР может гарантировать определение 1 молекулы вироида в 1000 и более клеток. Использование ПЦР существенно повышает надежность контроля, способствует быстрой диагностике в экстренных ситуациях, что особенно важно для своевременного выявления патологии исходного посадочного материала, полученного путем микроклонального размножения [4].

Поскольку в последние годы появляется все больше сообщений о наличии вириода в семеноводческих коллекциях картофеля [4] и его распространении по регионам страны, необходимость постоянного мониторинга существующих коллекций не вызывает сомнений. В связи с этим цель данной работы – провести анализ коллекции Биолого-почвенного института ДВО РАН на наличие вириода методом обратной транскрипции полимеразной цепной реакции.

Объектом исследования служили растения картофеля *Solanum tuberosum* L., полученные путем микрклонального размножения. Коллекция БПИ ДВО РАН депонируемого *in vitro* картофеля, оздоровленного от вирусов методом апикальной меристемы, насчитывает 35 сортов. Каждый образец коллекции (сорт, линия сорта) представлен тремя повторностями. Для анализа требуется одно растение; использовали микрорастение высотой до 12 см, весом 20-30 мг. Всего проанализировано 36 образцов (21 сорт, из них 7 сортов представлено 2-3 линиями) до четырех повторностей (табл.). С учетом того, что повышенные температуры стимулируют размножение ВВКК, пробирочные растения культивировали 1 мес при пониженной (19-20°C) и 1 мес при повышенной (до 25°C) температуре. Для всех исследованных 36 образцов получены данные о культивировании как минимум в одном варианте опыта (табл.). Для 21 образца (15 сортов) пробирочные растения культивировали со сменой температуры: вначале 1 мес при 19°C, затем 1 мес при 25°C (рис. 2). Диагностику проводили методом ПЦР с флуоресцентной детекцией результатов при помощи диагностических наборов производства ООО “Агродиагностика”; из образцов выделили суммарную РНК, которую использовали для постановки обратной транскрипции [2]. Амплификацию в режиме точного активного регулирования проводили на приборе T3 Thermocycler (Biometra, Германия). Анализ продуктов амплификации проводили посредством электрофореза фрагментов ДНК в 2.5% агарозном геле (рис. 1).

Анализ коллекции сортов картофеля БПИ ДВО РАН на наличие ВВКК показал, что метод ПЦР оказался достаточно результативным для диагностики вириода. Сравнение продуктов амплификации с контролем (ВВКК, рис. 1, слот 1) подтвердило наличие вириода в исследуемых образцах (рис. 1, слот 3).

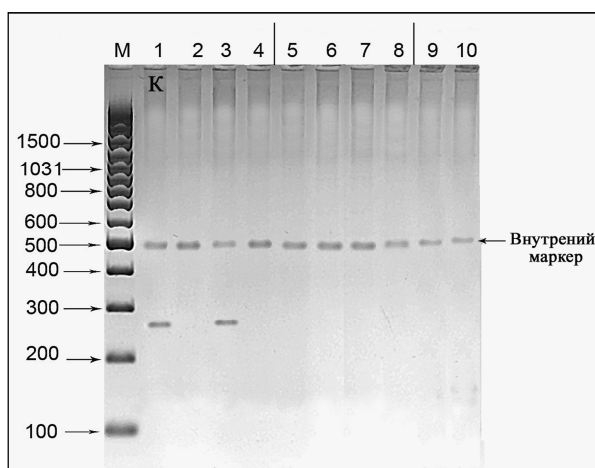


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР кДНК картофеля: К – контрольный образец, зараженный ВВКК; М – маркер молекулярных масс 100-bp-Label; 2-10 – исследуемые образцы; 3 – образец, пораженный ВВКК

Культивирование растений при 19°C (исследованы 23 образца) позволило выявить наличие ВВКК у 39.1% сортов и линий; во втором варианте опыта (25°C, 34 образца) вириод был обнаружен в 50% случаев (табл.). Для двух сортов (Аксамит,

Снегирь), которые культивировали в обоих вариантах опыта, вириод был выявлен только при 19°C, возможно, это связано с условиями проведения анализа ткани. В целом повышенные температуры способствовали размножению ВВКК и более эффективному его выявлению. В результате проведенных экспериментов установлено, что 44.4% исследованных образцов картофеля не инфицированы ВВКК (табл.).

Таблица

Анализ сортов картофеля из коллекции БПИ методом ПЦР на зараженность ВВКК при разных температурах культивирования

№	Сорт/ линия	19°C		25°C	
		I	II	I	II
1	Невский 1б			-	
2	Невский 4б			-	
3	Невский в			-	
4	Невский 1	+		+	
5	Невский 2	-	+	+	
6	Филатовский 4в			-	
7	Филатовский 2в			+	
8	Филатовский 3в			-	
9	Зинимару			-	
10	Аксамит	+		-	
11	Снегирь	+		-	
12	Пауль Вагнер	+			
13	Сантэ 1	+		+	
14	Сантэ 2			-	
15	Жуковский ранний 3б	+		+	
16	Жуковский ранний 4б	-		-	
17	Жуковский ранний 1	+		+	
18	Жуковский ранний 2	-		-	
19	Бронницкий	-	-	+	-
20	Луговской 1			+	
21	Луговской 2	-	-	-	
22	Удача 5	-		+	
23	Удача 11	-	-	+	
24	Удача 13	-	-	+	
25	Пушкинец	-		-	-
26	Синева	-	-	-	+
27	Елизавета	-		+	
28	Голубизна	-			
29	Кобблер	-		-	
30	Тулунский ранний	+		+	
31	Весна белая	-	-	-	+
32	При-12	-	-	+	
33	Адретта			-	
34	Рая 1б			-	
35	Рая 3в			+	
36	Рая 4б			-	

Примечание: + – наличие ВВКК, - – отсутствие ВВКК, пустая клетка – нет повторности.

Опыт со сменой температуры культивирования для одних и тех же растений (21 образец) показал, что количество образцов, для которых установлено заражение ВВКК, увеличилось на 29% (рис. 2). Следовательно, полученные результаты указывают на необходимость культивирования растений при повышенной температуре для максимально точной диагностики.

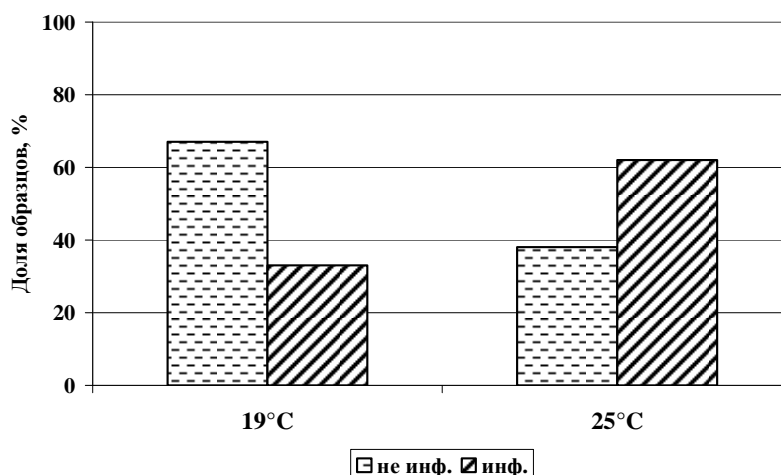


Рис. 2. Влияние температуры культивирования на выявление инфицированных ВВКК сортов картофеля в коллекции БПИ ДВО РАН (эксперимент со сменой температуры проведен на 21 образце)

Таким образом, подтверждена возможность использования метода ПЦР для диагностики ВВКК и показана необходимость культивирования сортов картофеля, депонируемых *in vitro*, при повышенной температуре для выявления вириода. Для поддержания чистоты коллекции требуется регулярный мониторинг ее состояния.

Выводы: 1. Для диагностики коллекции сортов картофеля БПИ ДВО РАН на ВВКК успешно применен метод ПЦР. 2. Проанализирована коллекция оздоровленных сортов картофеля, выращенных *in vitro*, выявлены и удалены инфицированные образцы растений. 3. Установлено, что свыше 40 % сортов коллекции являются незараженными.

Автор выражает искреннюю благодарность сотрудникам лаб. биотехнологии БПИ ДВО РАН Наконечной О.В. и Бабиковой А.В. за помощь в подготовке материалов.

Литература

1. Гирсова Н.В. Вириод веретеновидности клубней картофеля: диагностика, сохранение инфекционности и особенности передачи патогена. Дис. ... канд. биол. наук. Большие Вяземы. 2003. 25 с.
2. Рязанцев Д.Ю., Абрамов Д.Д., Анисимов Б.В. и др. Диагностика основных патогенов картофеля методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией результатов при помощи диагностических наборов производства ООО «АгроДиагностика». Методические указания. М., 2009. 26 с.
3. Малиновский В.И. Вириоды – мельчайшие патогены растений // Сельскохозяйственная биология. 2009. № 5. С. 17–24.
4. Мусин С.М., Бабоша А.В., Хромова Л.М. и др. Методические указания по диагностике вириода веретеновидности клубней картофеля при формировании, депонировании и управлении оздоровленным генобанком. М., 2003. 50 с.

Научное электронное издание
на компакт-диске

Конференция с международным участием
Регионы нового освоения:
Теоретические и практические вопросы изучения и
сохранения биологического и ландшафтного разнообразия

15-18 октября 2012 г., Хабаровск

Сборник докладов

Утверждено к печати Ученым советом ИВЭП ДВО РАН

Компьютерная верстка: Дробот Е.А.

Системные требования:
PC не ниже класса Pentium I;
32 Mb RAM; свободное место на HDD 16 MB;
Дисковод CD-ROM 2-х и выше; мышь;
Adobe Acrobat Reader

Подписано в печать 08.10.2012 г. Формат 60x84/8.
Уч.-изд. л. 26,05. Усл. печ. л. 45,1. Объем 16 Мб. Тираж 155 экз.
Институт водных и экологических проблем ДВО РАН
680000, г. Хабаровск, ул. Ким Ю Чена, 65 тел.: (4212)325755
E-mail: ivep@ivep.as.khb.ru; <http://ivep.as.khb.ru>