

ИММУНИТЕТ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ДИКИХ РОДИЧЕЙ

Научная статья
УДК 575.635.21+578.5
DOI: 10.30901/2227-8834-2023-3-207-213



Экспрессия гена фактора транскрипции *StTCP23* в растениях картофеля, инокулированных виroidом веретеновидности клубней

Н. В. Мироненко, А. С. Орина, 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. Виroid веретеновидности клубней картофеля PSTVd (potato spindle tuber viroid) – самый мелкий из всех известных возбудителей болезней картофеля – является кольцевой молекулой однонитевой РНК. Симптомы, вызываемые PSTVd, приводят к существенному снижению урожая клубней или гибели растения. Установлено, что виroidная инфекция запускает процесс «сайленсинга» генов хозяина и индуцирует симптомы болезни растения с помощью vd-sRNA. Одной из мишеней вироида является ген картофеля *StTCP23*, который кодирует фактор транскрипции. Целью исследования являлась оценка влияния инокуляции растений картофеля сорта ‘Colomba’ штаммом NicTr-3 вироида PSTVd на экспрессию гена *StTCP23* в инфицированном растении.

Материалы и методы. Растения картофеля сорта ‘Colomba’ инокулировали соком из листьев растений томата сорта ‘Rutgers’, в котором поддерживали штамм NicTr-3 вироида PSTVd. Факт заражения подтверждали методом ОТ-ПЦР со специфичными праймерами. Разнообразие молекул в популяции вироида выявляли с помощью клонирования и последующего секвенирования клонов вироида. Экспрессию гена *StTCP23* в инфицированных растениях картофеля оценивали методом количественной ПЦР относительно гена фактора элонгации *ef1a*.

Результаты. Фенотипические проявления заражения сорта ‘Colomba’ штаммом NicTr-3 вироида PSTVd не выявлены, тогда как факт заражения подтвержден молекулярными методами. Установлено присутствие 10 мутаций в отдельных вариантах штамма NicTr-3, ответственных за снижение агрессивности штамма. Показано повышение экспрессии гена *StTCP23* в листьях растений картофеля сорта ‘Colomba’, инокулированных штаммом NicTr-3, по сравнению с контролем.

Заключение. Механизм взаимодействия вироида и гена *StTCP23* в зараженном растении картофеля не является универсальным и зависит как от генотипа сорта картофеля, так и от штамма вироида. Для доказательства существования специфических механизмов взаимодействия генотипа сорта и генотипа штамма вироида необходимы дополнительные исследования.

Ключевые слова: PSTVd, сорт ‘Colomba’, мутации вироида, патогенность, агрессивность

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

Авторы выражают благодарность исполнительному директору СПССК «Устюженский картофель» (Вологодская область) А. А. Кузнецову за предоставленные для исследования клубни картофеля сорта ‘Colomba’.

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

Для цитирования: Мироненко Н.В., Орина А.С., Лашина Н.М., Афанасенко О.С. Экспрессия гена фактора транскрипции *StTCP23* в растениях картофеля, инокулированных виroidом веретеновидности клубней. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2023;184(3):207-213. DOI: 10.30901/2227-8834-2023-3-207-213

IMMUNITY OF CULTIVATED PLANTS AND THEIR WILD RELATIVES

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2023-3-207-213

Expression of the transcription factor encoding gene *StTCP23* in potato plants infected with the tuber spindle viroid

Nina V. Mironenko, Alexandra S. Orina, 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 The potato spindle tuber viroid (PSTVd) is the smallest of all known potato pathogens. PSTVd is a circular, single-stranded RNA molecule that does not code for proteins. Symptoms caused by PSTVd lead to a significant reduction in tuber yield or death of the plant. PSTVd infection triggers the silencing of host-plant genes and induces disease symptoms in the plant via vd-sRNA. The *StTCP23* potato gene which encodes a transcription factor is one of the targets of PSTVd. The aim of the study was to assess the effect of inoculation of potato plants of cv. 'Colomba' with the PSTVd viroid NicTr-3 strain on the *StTCP23* expression in infected plants.

Materials and methods. Potato plants of cv. 'Colomba' were inoculated with leaf sap of the tomato cv. 'Rutgers' in which the PSTVd viroid NicTr-3 strain was propagated. RT-PCR with specific primers was used to confirm the infection of potato plants with the viroid. Diversity of RNA molecules in the PSTVd population was revealed using RT, cloning, and sequencing of the viroid. The expression of the *StTCP23* gene in infected potato plants was assessed by quantitative PCR with the *ef1a* gene as a reference.

Results. Symptoms of infecting 'Colomba' plants with the PSTVd viroid strain NicTr-3 were not detected, while the presence of the viroid in potato leaves was confirmed by molecular methods. Ten mutations were found in individual variants of the PSTVd strain NicTr-3, responsible for reducing the viroid's aggressiveness. An increase in the expression of *StTCP23* was shown at 3 time points in 'Colomba' plants inoculated with the NicTr-3 strain compared to the control.

Conclusion. The mechanism of interaction between PSTVd and the *StTCP23* gene in an infected potato plant is not universal and depends both on the potato genotype and viroid strain. Additional studies are required to prove the existence of specific interaction mechanisms between the host-plant and viroid strain genotypes.

Keywords: PSTVd, cv. 'Colomba', viroid mutations, pathogenicity, aggressiveness

Acknowledgements: the research was supported by a grant from the Russian Science Foundation: No. 20-46-07001 "Molecular and genetic mechanisms of plant pathogen interaction in the pathosystem of *Solanum* spp. – the potato spindle tuber viroid and features of the viroid's epidemiology on potato".

The authors express their gratitude to A. A. Kuznetsov, Executive Director of the Ustyuzhensky Potato Co-op, Vologda Province, for providing 'Colomba' potato tubers for the study.

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

For citation: Mironenko N.V., Orina A.S., Lashina N.M., Afanasenko O.S. Expression of the transcription factor encoding gene *StTCP23* in potato plants infected with the tuber spindle viroid. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2023;184(3):207-213. DOI: 10.30901/2227-8834-2023-3-207-213

Введение

Вироид веретеновидности клубней картофеля PSTVd (potato spindle tuber viroid) является высококонтагиозным карантинным возбудителем заболевания, имеет широкое географическое распространение и выявлен на всех континентах, в том числе локально распространен и на территории России (Kastalyeva et al., 2013; Owens et al., 2009; Matsushita et al., 2021). Вироид PSTVd представляет собой одноцепочечную кольцевую молекулу РНК длиной около 360 нуклеотидов, не обладающую способностью кодировать белки (Katsarou et al., 2022) и использующую транскрипционный механизм хозяев (Hadidi et al., 2017). Репликация PSTVd сопровождается накоплением виroid-производных малых РНК (vd-sRNA). В инфицированных виroidом растениях картофеля разных сортов было отмечено накопление vd-sРНК длиной от 21 до 24 нуклеотидов, которые играют центральную роль в развитии болезни (Bao et al., 2019a; Cottilli et al. 2019; Kitabayashi et al., 2020).

Известно, что проявление симптомов заболевания у растений картофеля, зараженных PSTVd, ассоциировано с нарушением экспрессии («сайленсингом») гена *StTCP23*, в котором участвуют vd-sРНК (Bao et al., 2019a). Ген картофеля *StTCP23* относится к семейству генов факторов транскрипции TCP (the teosinte branched1/Cydoidea/proliferating cell factor), которые играют ключевую роль в росте и развитии растений (Bao et al., 2019b; Fang et al., 2021; Ren et al., 2021). Показано, что нуклеотидная последовательность размером 21 нуклеотид в 3'-нетранслируемом регионе этого гена в растениях картофеля сорта 'Atlantic' комплементарна участку генома VMR (virulence modulating region) штамма RG1 PSTVd, контролирующего патогенность виroidа (Bao et al., 2019a). Выявлено существенное снижение в три раза экспрессии гена *StTCP23* у растений сорта 'Atlantic' через 60 дней после инокуляции виroidом PSTVd на фоне развития симптомов инфицирования – угнетенного роста растений, образования мелких веретеновидных клубней, снижения урожая (Bao et al., 2019a). Однако универсальность выявленного механизма взаимодействия виroidа с геном *StTCP23* для сортов картофеля, несущих другие аллели этого гена, требует уточнения.

Целью исследования являлась оценка влияния инокуляции растений сорта 'Colomba' штаммом NicTr-3 виroidа PSTVd на экспрессию гена *StTCP23* в инфицированном растении.

Материалы и методы

Материалом исследования являлись растения картофеля сорта 'Colomba', который ранее был оценен по устойчивости к различным штаммам виroidа веретеновидности клубней и отнесен к восприимчивым сортам (Afanasenko et al., 2022b). Клубни картофеля (репродукция супер-элиты) были получены из семеноводческого хозяйства «Устюженский картофель» (Вологодская область). Также в исследование был включен штамм NicTr-3 виroidа PSTVd, выделенный из картофеля сорта 'Никулинский' и сохраненный на растениях томата сорта 'Rutgers', в отношении которого он продемонстрировал высокую патогенность (Afanasenko et al., 2022a). Нуклеотидная последовательность виroidа NicTr-3 депонирована в базу данных NCBI GenBank (номер LC654171, Matsushita et al., 2021).

Растения картофеля выращивали в теплице при температуре $25 \pm 2^\circ\text{C}$ с фотопериодом 16 часов света (TL-FITO L1517 88 VR, LED Brand: OSRAM OSOLON® SSL) и 8 часов темноты. Каждый клубень высаживали в пластиковый сосуд объемом 2000 см³, наполненный грунтом «Терра Вита». Инокуляцию растений картофеля проводили с помощью сока из листьев растений томата сорта 'Rutgers', инфицированных штаммом виroidа NicTr-3, по методике, описанной ранее (Afanasenko et al., 2022a). Опыт проводили в трехкратной биологической повторности. На 14-е сутки отмечали фенотипические проявления инфицирования растений картофеля виroidом. Через 90 дней оценивали степень поражения образовавшихся клубней (наличие деформации), их количество и массу.

Для молекулярной детекции виroidа в растениях томата и картофеля, а также анализа экспрессии генов картофеля проводили выделение тотальной РНК из тканей листьев. Отбор проб листьев томата сорта 'Rutgers', который использовали для размножения виroidа, проводили на 30 сутки после инокуляции растений штаммом NicTr-3. Отбор проб листьев картофеля проводили перед инокуляцией (возраст растений – 14 суток от всходов), а также на 14, 30 и 60-е сутки после инокуляции растений виroidом. Одновременно проводили отбор проб листьев неинокулированных растений картофеля. Листовые доли верхнего яруса срезали по 3 штуки из каждой биологической повторности стерильными ножницами и помещали в жидкий азот, затем хранили в морозильной камере при температуре -80°C . Экстракцию общей РНК из 0,1 г ткани листа осуществляли с помощью RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Германия) согласно инструкциям производителя. Детекцию PSTVd производили методом ПЦР с обратной транскрипцией с помощью набора реагентов PrimerScript One Step RT-PCR kit ver 2 (Takara Bio Inc., Япония) и праймеров P3/P4 (Behjatnia et al., 1996). Амплификацию выполняли на термощелке MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, США) по следующему протоколу: $50^\circ - 30$ мин; $94^\circ - 2$ мин; [$94^\circ - 30$ с, $60^\circ - 30$ с, $72^\circ - 30$ с] $\times 35$; $72^\circ - 5$ мин. Электрофорез продуктов реакции проводили в 1,7-процентном агарозном геле. Размер диагностического фрагмента виroidа PSTVd составлял 360 пн. Очистку продукта амплификации из агарозного геля осуществляли с помощью набора Cleanup Standard («Евроген», Россия).

Для идентификации штамма NicTr-3 виroidа в растениях томата осуществляли клонирование продукта амплификации и последующее секвенирование (фирма Beagle, Санкт-Петербург, Россия), а также обработку данных с помощью программного обеспечения Vector NTI Advance 10 (Thermo Fisher Scientific, США). Нуклеотидную последовательность четырех клонов виroidа, полученных из РНК сока растения томата сорта 'Rutgers', сравнили с референсной последовательностью штамма NicTr-3 (номер LC654171). Описание мутаций проводили согласно предложенной структуре генома PSTVd (Keese, Symon, 1985), состоящего из 5 доменов: левый терминальный (TL), включающий нуклеотиды с 1 по 46 и 316–359, домен патогенности (P) – 46–74 позиции нуклеотидов и 288–316, центральный консервативный регион (C) – 74–120 и 241–288 позиции, варибельный регион (V) – 120–140 и 212–241 и терминальный правый домен (TR) – 140–212.

Также в образцах тотальной РНК, выделенной из тканей листьев картофеля, оценивали экспрессию гена *StTCP23*. кДНК синтезировали методом ОТ-ПЦР на матри-

це тотальной РНК (1-2 мкг) с помощью набора реактивов MMLV RT kit («Евроген», Россия). Реакции кПЦР проводили в объеме 20 мкл, содержащем 4 мкл 5×qPCRMix-HS SYBR мастер-микса («Евроген», Россия), 500 нМ каждого праймера и 2 мкл раствора кДНК с использованием следующего протокола амплификации: 50° – 2 мин; 95° – 15 мин; [95° – 15 с; 62° – 60 с] × 40 на термоциклере CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, США). Для детекции гена-мишени *StTCP23* использовали праймеры *StTCP23-PCR3F* (GGGGAAGTTAAATACAATAGT) и *R* (CAAGAAATTTATTTTGCCTTA) (Bao et al., 2019a). В качестве референсного гена использовали ген фактора элонгации *ef1a*, который амплифицировали с праймерами *ef1aF* (ATTGGAAACGGATATGCTCCA) и *ef1aR* (TCCTTACCTGAACGCCTGTCA) (Slugina et al., 2020). Эксперимент проводили в трехкратной повторности. Обработку первичных данных осуществляли с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager 1.6. Относительную экспрессию генов рассчитывали по формуле $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, Schmittgen, 2002).

Результаты

На 14-е сутки после инокуляции растений картофеля сорта 'Colomba' штаммом NicTr-3 вириода PSTVd, а также в процессе последующих еженедельных наблюдений за весь период проведения эксперимента фенотипические проявления заболевания растений картофеля, а также видоизменения клубней после окончания вегетации отмечены не были.

Инфицирование растений картофеля сорта 'Colomba' вириодом было подтверждено путем ОТ-ПЦР с пробами общей РНК, выделенной из листьев растений. Продукт амплификации 360 пн вириода с праймерами, специфичными для PSTVd, отмечен в пробах, отобранных на 14-е сутки после инокуляции картофеля. На 30 и 60-е сутки после инокуляции специфичный продукт амплифицировался более интенсивно, что свидетельствует о репликации вириода в листьях растения и увеличении его концентрации.

Анализ нуклеотидной последовательности четырех клонированных вариантов продукта амплификации штамма NicTr-3 вириода PSTVd, выделенного из инфицированных растений картофеля, выявил 10 мутаций (от 3 до 5 в каждом клоне) по сравнению с референсной последовательностью штамма NicTr-3 (таблица).

Мутации в позициях 67 и 309 в домене патогенности Р генома вириода, причем в позиции 309 два типа мутаций – замена и делеция, отмечены у всех четырех клонов штамма NicTr-3. Кроме этого, выявлены три мутации

в центральном домене С (позиции 117, 120 и 285), три мутации в домене V (позиции 214, 226 и 125) и одна мутация в левом терминальном домене (позиция 324) относительно референсного штамма NicTr-3.

В пробах листьев, собранных в разные дни из инокулированных штаммом NicTr-3 растений картофеля, выявлено существенное увеличение относительной экспрессии гена *StTCP23* до 2,7–5,0 раз по сравнению с относительной экспрессией гена в растении перед инокуляцией (рисунок). Относительная экспрессия гена *StTCP23* в неинокулированном картофеле сорта 'Colomba' (контроль) варьировала в диапазоне от 1,2 до 1,8 и не имела существенных отличий в пробах листьев, срезанных в разные дни. Установлено достоверное различие в уровне относительной экспрессии гена *StTCP23* в инокулированных вириодом и в здоровых растениях картофеля на 30-е сутки после инокуляции ($p = 0,03$).

Обсуждение результатов

Взаимосвязь между уровнем экспрессии генов факторов транскрипции *TCP* в растениях картофеля и их заражением вириодом PSTVd остается малоизученной. В работе Bao et al. (2019a) выбор материала исследования был обусловлен максимальной восприимчивостью сорта 'Atlantic' и высокой патогенностью штамма RG1 вириода, что позволило выявить «сайленсинг» гена *StTCP23* при инфицировании вириодом и описать механизм этого процесса на молекулярном уровне, а также отметить фенотипические проявления заболевания – угнетение роста растения, деформацию листьев и клубней. Ключевым условием для «сайленсинга» гена *StTCP23* в картофеле сорта 'Atlantic', индуцированного заражением растения сильно патогенным, «летальным» штаммом RG1, является гомология таргетного участка гена, локализованного в нетранслируемой 3'-UTR области мРНК, и малых РНК, производных от штамма RG1, начинающихся с позиций 45, 46 или 47 генома вириода (Bao et al., 2019a).

Известно, что последовательности *vd-sRNA* (позиции 45–65) штамма RG1 вириода PSTVd были также гомологичны таргетному участку гена *LRR-RSTPK* (LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase) томата сорта 'Rutgers', а *vd-sRNA* из варибельного домена (позиции 120–141) вириода «нацелены» на ген *STPK* (serine/threonine-protein kinase) томата и, что особенно интересно, *vd-sRNA* из терминального левого домена (позиции 353–333) вириода оказалась гомологичной участку гена *RSTPK* – киназы, которая является трансмембранным белком, вовлеченным в различные пути,

Таблица. Гетерогенность вариантов штамма NicTr-3 вириода веретеновидности клубней картофеля

Table. Heterogeneity of the variants of the potato spindle tuber viroid strain NicTr-3

Варианты штамма / Strain variants	Мутации в клонах штамма NicTr-3 в сравнении с референсной последовательностью* / Mutations in NicTr-3 strain variants compared to the reference sequence*								
NicTr-3-v1	C67G		C120U		C214U	C226T			
NicTr-3-v2		117+A	C120A					A309_	
NicTr-3-v3	C67G		C120U				C285U	A309_	A324G
NicTr-3-v4	C67G		C120U	A125G				A309U	

Примечание: * – «_» – делеция; «+» – инсерция

Note: * – deletion is marked as _; insertion is marked as +

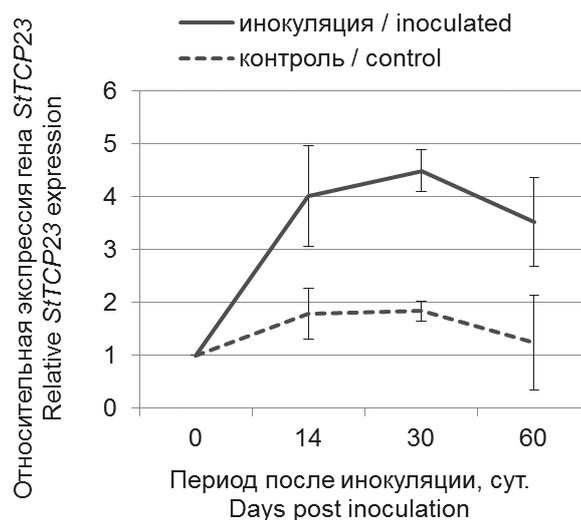


Рисунок. Относительная экспрессия гена *StTCP23* в инокулированных виroidом PSTVd NicTr-3 и здоровых (контроль) растениях картофеля сорта 'Colomba'

Figure. Relative expression of the *StTCP23* gene in potato plants of cv. 'Colomba' inoculated with the PSTVd NicTr-3 viroid compared to non-inoculated plants (control)

связанные с развитием растения и устойчивостью к болезни (Adkar-Purushothama, Perreault, 2018).

Фенотипические системные изменения в развитии растений, вызванные виroidной инфекцией, связывают с изменением генной экспрессии. Известны примеры как уменьшения (down-regulation), так и увеличения (up-regulation) экспрессии генов *SIBIGPETAL1* (Bhlh-фактор транскрипции) и *SIOVA6* (proline-like tRNA synthetase) соответственно в результате инокуляции томата сорта 'Rutger' виroidами TPMVd (tomato planta macho viroid) и MPVd (Mexican papita viroid) из сем. Pospiviroidae (Авиñá-Padilla et al., 2018).

Ранее нами было проведено исследование аллельного полиморфизма региона 3'UTR гена *StTCP23* картофеля (Mironenko et al., 2023), который является целевым участком для взаимодействия с vd-sRNA PSTVd. В восьми сортах картофеля были выявлены различные типы аллелей *StTCP23*. Причем у сорта 'Colomba' встречались аллели типа С, идентичные аллели у сорта 'Atlantic', представленной в модельном дуплексе мРНК 3'UTR гена *StTCP23* и vd-sRNA летального штамма RG1 виroidа (Bao et al., 2019a). Анализ нуклеотидного состава штамма NicTr-3 PSTVd выявил только одну мутацию в области Р домена (позиции нуклеотидов 45-67), которая гомологична целевому участку 3'UTR гена *StTCP23*.

В данном исследовании видимые симптомы поражения растений картофеля виroidом не были зафиксированы, хотя факт инокуляции и накопление виroidа в тканях листьев выявлен с помощью молекулярных методов. Можно сделать вывод, что штамм NicTr-3 виroidа, продемонстрировавший высокую агрессивность в отношении томата сорта 'Rutgers' (Afanasenko et al., 2022b), для картофеля оказался слабоагрессивным, в отличие от штамма RG1, использованного ранее (Bao et al., 2019a).

Ранее при инокуляции растений сорта 'Colomba' штаммом NicTr-3 виroidа симптомы болезни проявились в виде угнетенного роста растений, деформации листьев и клубней (Afanasenko et al., 2022b). В данном исследовании инокуляция растений картофеля и анализ экспрессии гена *StTCP23* в них был проведен позднее

примерно на один год, в течение которого штамм NicTr-3 поддерживался на растениях томата сорта 'Rutgers'. Вероятно, за время культивирования на томате штамм виroidа накопил в своей популяции мутантные варианты с низкой в отношении картофеля вирулентностью. Это объясняет увеличение экспрессии гена *StTCP23* картофеля при инфицировании растений сорта 'Colomba' этим штаммом, выявленное в данном исследовании, тогда как ранее было показано снижение экспрессии *StTCP23* в растениях картофеля сорта 'Atlantic', инфицированных штаммом RG1 (Bao et al., 2019a). Таким образом, полученные результаты не подтверждают универсальность механизма взаимодействия виroidа и гена фактора транскрипции картофеля *StTCP23*, который, очевидно, зависит как от разнообразия мутаций в популяции молекул виroidа, так и от аллельного состава гена *StTCP23*, специфичного для каждого сорта картофеля.

Известно существенное влияние мутаций на патогенность штаммов виroidа в отношении томата. Например, мутации в нуклеотидных позициях 42 и 64 генома штамма PSTVd-I существенно ослабляли его патогенность в отношении томата сорта 'Rutgers', что выражалось как в уменьшении развития видимых симптомов, так и в снижении аккумуляции виroidа в зараженном растении (Kitabayashi et al., 2020). По всей видимости, вторичная структура VMR региона (нуклеотиды в позициях 43-59) играет важную роль в патогенности штаммов виroidа, а именно индуцирует изменения в термодинамической стабильности локальной вторичной структуры, что влияет на патогенность посредством взаимодействия с неидентифицированными факторами хозяина (Górra et al., 1994, 1996; Owens et al., 1995).

Центральный регион генома PSTVd также играет критическую роль в патогенности виroidа. Например, замена одного нуклеотида в позиции 257 (U на A) в штамме PSTVd-lwt вызывала сильные симптомы болезни и преждевременную гибель инфицированных этим штаммом растений томата (Qi, Ding, 2003), а замена нуклеотида U на C в позиции 259 привела к образованию мутанта, способного легко заражать растения табака *Nicotiana tabacum* (Wassenegger et al., 1996).

Заключение

При инокуляции растений картофеля сорта 'Colomba' штаммом NicTr-3 вириода веретеновидности клубней PSTVd фенотипические изменения растений в течение всего периода наблюдений, а также видоизменения клубней после окончания вегетации не выявлены. В то же время факт инфицирования и накопления вириода в тканях подтверждены молекулярными методами. В популяции молекул вириода NicTr-3, поддерживаемой на томате сорта 'Rutgers', найдены 10 мутаций в сравнении с исходной последовательностью штамма, которые привели к снижению агрессивности штамма в отношении картофеля.

Также установлено увеличение экспрессии гена *StTCP23* в листьях растений картофеля, инокулированных штаммом NicTr-3 вириода PSTVd. Полученные результаты не подтвердили универсальность механизма взаимодействия вириода PSTVd и гена *StTCP23*, который, по всей видимости, зависит как от разнообразия мутаций в популяции молекул вириода, так и от аллельного состава гена *StTCP23*, специфичного для каждого сорта картофеля.

Для доказательства существования специфических механизмов взаимодействия генотипа сорта и генотипа штамма вириода необходимы дополнительные исследования.

References / Литература

- Adkar-Purushothama C.R., Perreault J.P. Alterations of the viroid regions that interact with the host defense genes attenuate viroid infection in host plant. *RNA Biology*. 2018;15(7):955-966. DOI: 10.1080/15476286.2018.1462653
- Afanasenko O.S., Khiutti A.V., Mironenko N.V., Lashina N.M. Transmission of potato spindle tuber viroid between *Phytophthora infestans* and host plants. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022a;26(3):271-280. DOI: 10.18699/VJGB-22-34
- Afanasenko O.S., Lashina N.M., Mironenko N.V., Kyrova E.I., Rogozina E.V., Zubko N.G. et al. Evaluation of responses of potato cultivars to potato spindle tuber viroid and to mixed viroid/viral infection. *Agronomy*. 2022b;12(12):2916. DOI: 10.3390/agronomy12122916
- Aviña-Padilla K., Rivera-Bustamante R., Kovalskaya N.Y., Hammond R.W. Pospiviroid infection of tomato regulates the expression of genes involved in flower and fruit development. *Viruses*. 2018;10(10):516. DOI: 10.3390/v10100516
- Bao S., Owens R.A., Sun Q., Song H., Liu Y., Eamens A.L. et al. Silencing of transcription factor encoding gene *StTCP23* by small RNAs derived from the virulence modulating region of potato spindle tuber viroid is associated with symptom development in potato. *PLoS Pathogens*. 2019a;15(12):e1008110. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008110
- Bao S., Zhang Z., Lian Q., Sun Q., Zhang R. Evolution and expression of genes encoding TCP transcription factors in *Solanum tuberosum* reveal the involvement of *StTCP23* in plant defence. *BMC Genetics*. 2019b;20(1):91. DOI: 10.1186/s12863-019-0793-1
- Behjatnia A., Dry I., Krake L., Condé B.D., Connelly 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
- Cottilli P., Belda-Palazón B., Adkar-Purushothama C.R., Perreault J.P., Schleiff E., Rodrigo I. et al. Citrus exocortis viroid causes ribosomal stress in tomato plants. *Nucleic Acids Research*. 2019;47(16):8649-8661. DOI: 10.1093/nar/gkz679
- Fang Y., Zheng Y., Lu W., Li J., Duan Y., Zhang S. et al. Roles of miR319-regulated TCPs in plant development and response to abiotic stress. *The Crop Journal*. 2021;9(1):17-28. DOI: 10.1016/j.cj.2020.07.007
- Góra A., Candresse T., Zagórski W. Analysis of the population structure of three phenotypically different PSTVd isolates. *Archives of Virology*. 1994;138(3-4):233-245. DOI: 10.1007/BF01379128
- Góra A., Candresse T., Zagórski W. Use of intramolecular chimeras to map molecular determinants of symptom severity of potato spindle tuber viroid (PSTVd). *Archives of Virology*. 1996;141(11):2045-2055. DOI: 10.1007/BF01718214
- Hadidi A., Flores R., Randles J.W., Palukaitis P. (eds.) *Viroids and Satellites*. Oxford; Cambridge, MA: Academic Press; 2017.
- Kastalyeva T.B., Girsova N.V., Mozhaeva K.A., Lee I.M., Owens R.A. Molecular properties of potato spindle tuber viroid (PSTVd) isolates of the Russian Research Institute of Phytopathology. *Molecular Biology*. 2013;47(1):85-96. DOI: 10.1134/S0026893312060106
- Katsarou K., Adkar-Purushothama C.R., Tassios E., Samiotaki M., Andronis C., Lisón P. et al. Revisiting the non-coding nature of pospiviroids. *Cells*. 2022;11(2):265. DOI: 10.3390/cells11020265
- Keese P., Symons R.H. Domains in viroids: evidence of intermolecular 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
- Kitabayashi S., Tsushima D., Adkar-Purushothama C.R., Sano T. Identification and molecular mechanisms of key nucleotides causing attenuation in pathogenicity of dahlia isolate of potato spindle tuber viroid. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(19):7352. DOI: 10.3390/ijms21197352
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
- 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(8):529-542. DOI: 10.1007/s10658-021-02339-z
- Mironenko N.V., Kochetov A.V., Afanasenko O.S. Influence of allelic polymorphism of the 3' untranslated region of the *StTCP23* gene on the tolerance of potato varieties to the spindle tuber viroid. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2023;184(1):137-143. [in Russian] (Мироненко Н.В., Кочетов А.В., Афанасенко О.С. Влияние аллельного полиморфизма 3'нетранслируемой области гена *StTCP23* на толерантность сортов картофеля к вириоду веретеновидности клубней. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2023;184(1):137-143). DOI: 10.30901/2227-8834-2023-1-137-143
- Owens R.A., Chen W., Hu Y., Hsu Y.H. Suppression of potato spindle tuber viroid replication and symptom expression by mutations which stabilize the pathogenicity domain. *Virology*. 1995;208(2):554-564. DOI: 10.1006/viro.1995.1186
- 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
- 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
- Ren L., Wu H., Zhang T., Ge X., Wang T., Zhou W. et al. Genome-wide identification of TCP transcription factors family in sweet potato reveals significant roles of miR319-targeted TCPs in leaf anatomical morphology. *Frontiers in Plant Science*. 2021;12:686-698. DOI: 10.3389/fpls.2021.686698
- Slugina M.A., Filyushin M.A., Meleshin A.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Differences in the amylase inhibitor gene *SbAI* expression in potato during long-term tuber cold storage and in response to short-term cold stress. *Russian Journal of Genetics*. 2020;56(3):375-378. DOI: 10.1134/S1022795420030163
- Wassenegger M., Spieker R.L., Thalmeir S., Gast F.U., Riedel L., Sanger H.L. A single nucleotide substitution converts potato spindle tuber viroid (PSTVd) from a noninfectious to an infectious RNA for *Nicotiana tabacum*. *Virology*. 1996;226(2):191-197. DOI: 10.1006/viro.1996.0646

Информация об авторах

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

Александра Станиславовна Орина, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, 196608 Россия, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, 3, orina-alex@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-7657-6618>

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

Ольга Сильвестровна Афанасенко, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, 196608 Россия, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. 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 Institute of Plant Protection, 3 Podbelskogo Hwy., Pushkin, St. Petersburg 196608, Russia, nina2601mir@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-3383-2973>

Aleksandra S. Orina, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, All-Russian Institute of Plant Protection, 3 Podbelskogo Hwy., Pushkin, St. Petersburg 196608, Russia, orina-alex@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-7657-6618>

Nina M. Lashina, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, All-Russian 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), Leading Researcher, All-Russian 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 02.11.2022; одобрена после рецензирования 05.12.2022; принята к публикации 04.09.2023.

The article was submitted on 02.11.2022; approved after reviewing on 05.12.2022; accepted for publication on 04.09.2023.