

*K.P. Aubakirova**, *Zh.N. Bakytzhanova*, *L.S. Erbolova*, *A. Rakhattyzy*, *N.N. Galiakparov*
Institute of Molecular Biology and Biochemistry named after M.A. Aitkhozhin, Almaty,
*Kazakhstan, karla_78@mail.ru**, *bakytzhanovazhibek@gmail.com*, *yerbolova.laura7@gmail.com*,
akbotarahattyzy1@gmail.com, *nurbol.gal@gmail.com*

AN IMPROVED METHOD OF RNA ISOLATION FOR MOLECULAR DIAGNOSTICS OF FRUIT AND BERRY VIRUSES

Abstract

Efficient isolation of high-quality RNA is an important step in the detection of plant RNA viruses by molecular methods. RNA isolation from grape, apple and other fruit leaves is problematic due to the presence of polysaccharides, polyphenols and other compounds that bind to or co-precipitate with RNA. In this work, a cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)-based protocol for RNA isolation from grape, apple, apricot, plum and walnut leaves was optimized. The concentrations of PVP, 2-mercaptoethanol and CTAB were increased. Incubation times with CTAB extraction buffer at 65 °C were optimized for each culture. For grape and apple leaves, the optimal incubation time is 40 minutes, for apricot leaves – 20 minutes, for plum and walnut leaves – 30 minutes. A comparative study of three different RNA extraction methods showed that the optimized protocol provides the highest quality and quantity of isolated RNA, as confirmed by electrophoresis and spectrophotometric analysis. RNA isolated using our protocol is suitable for subsequent molecular analyses, such as cDNA synthesis and PCR, demonstrating its suitability for the detection of viruses in various fruit tree species, including grape, apple, apricot, plum and walnut. The modified method is recommended for use in further studies on the detection of plant RNA viruses by PCR.

Keywords: grape, apple, apricot, plum, walnut, RNA extraction, viruses of fruit plants, CTAB.

МРНТИ 34.25.21

DOI <https://doi.org/10.37884/3-2024/13>

Л.Т. Надирова^{1,2}, Г.Э. Станбекова¹, Б.К. Искаков¹, А.В. Жигайлов¹*

¹ *Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, г. Алматы, Казахстан, leila.nadirova@gmail.com**

² *КазНУ имени аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан, gulshanst@yahoo.com, bulat.iskakov@mail.ru, andrzhjglov@mail.ru*

ДИАГНОСТИКА ВИРОИДА ЛАТЕНТНОЙ МОЗАИКИ ПЕРСИКА (PLMVd) МЕТОДОМ ОТ-ПЦР

Аннотация

Вироиды, мельчайшие растительные патогены, наносят значительный экономический ущерб сельскому хозяйству во всем мире. В настоящее время большое внимание уделяется их своевременной диагностике с целью предотвращения их дальнейшего распространения. Впервые на территории Республики Казахстан была проведена молекулярная диагностика вириода PLMVd – возбудителя латентной мозаики персика, входящего в перечень карантинных патогенов на территории стран ЕАЭС. Образцы листьев груш, вишен, персиков и абрикосов, собранных в Алматинской области, были проанализированы на присутствие вириода. Обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) в присутствии разработанных нами специфических праймеров, выявила в двух образцах персика, произрастающих на территории г. Алматы и Карасайском районе Алматинской области, ДНК-фрагмент длиной 338 пар нуклеотидов. ПЦР-продукты были клонированы в бактериальный вектор с последующим определением их нуклеотидной последовательности. Секвенирование

по Сэнгеру и проведенный BLAST-анализ подтвердили присутствие нуклеиновой кислоты PLMVd в изучаемых образцах. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей местных изолятов PLMVd показал их сходство между собой на 95,5% и на 81-96% с опубликованными вариантами из других стран.

Ключевые слова: *вириод, PLMVd, ОТ-ПЦР, клонирование, секвенирование, нуклеотидный анализ.*

Введение

Вириоды – малые инфекционные агенты, вызывающие ряд экономически важных заболеваний растений. Они представляют собой кольцевые одноцепочечные молекулы РНК, размер генома которых варьирует в пределах 250-400 нуклеотидов [1]. Вириоды вызывают эпинастию и хлороз листьев, деформацию цветков, плодов и запасных органов, растрескивание стеблей и коры, задержку роста, карликовость и т.д. [2].

Они подразделяются на два семейства, *Pospiviroidae* и *Avsunviroidae*, представители которых используют ферментные системы клетки-хозяина для автономной репликации в ядре и хлоропластах соответственно. Предполагается, что они вызывают заболевания, вмешиваясь в процессы регуляции работы генов хозяина [2].

Вириод латентной мозаики персика (Peach latent mosaic viroid, PLMVd), поражающий семечковые и косточковые плодовые культуры, такие как персик, абрикос, сливу, грушу, вишню в настоящее время наряду с вириодом карликовости хризантем (*Chrysanthemum stunt viroid*, CSVd) и вириодом веретенковидности клубней картофеля (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd) внесен в перечень патогенов, имеющих карантинное значение во многих странах, в том числе на территории РК и Евразийского экономического союза (Приложение 1 к приказу Министра сельского хозяйства Республики Казахстан от 30 марта 2015 года № 4-4/282 (с изменениями и дополнениями по состоянию на 30.04.2021 г.), «Перечень карантинных объектов и чужеродных видов, по отношению к которым устанавливаются и осуществляются мероприятия по карантину растений»; Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 30 ноября 2016 г. № 158).

Ранее нами впервые на территории Казахстана были выявлены вириоды PSTVd, AFCVd, PBCVd и GYSVd [3, 4]. Однако диагностика PLMVd в стране до настоящего времени не проводилась.

PLMVd является представителем рода *Pelamoviroid*, входящего в состав семейства *Avsunviroidae*, представители которых обладают рибозимной активностью и реплицируются в хлоропластах. Его геном представлен кольцевой РНК длиной 337–339 нуклеотидов, свернутой в сложную разветвленную вторичную структуру [5, 6]. Он широко распространен в Европе, Азии, Северной и Южной Америке. Особенностью этого вириода является тот факт, что зараженное молодое растение длительное время до 5-7 лет не проявляет симптомы, и может служить источником дальнейшего распространения патогена в основном через инструменты, используемые для обрезки и прививки растений. Основными признаками поражения растений PLMVd являются задержка цветения, мозаичность в окраске листьев, неправильная форма плодов, появление трещин и ямок на стволе [7].

Для диагностики вириодов иммуноферментный анализ (ИФА), широко используемый для детекции вирусов, неприменим, поскольку вириоды не кодируют белки. В настоящее время для обнаружения PLMVd используют биологические тесты на растениях-индикаторах, занимающие много времени [7]. Другим методом является метод молекулярной гибридизации [8]. Метод предусматривает получение меченного РНК-зонда путем транскрипции *in vitro* уже клонированного геномного фрагмента вириода. Описаны методы диагностики ОТ-ПЦР в классическом формате, заключающиеся в анализе продуктов амплификации путем электрофореза в гелях [9, 10]. Также используются методы ОТ-ПЦР в реальном времени, методы петлевой изотермической амплификации RT-LAMP и RT-RPA, детекция на ДНК-микрочипах [11 - 16].

Проведение мониторинга инфекций в юго-восточном Казахстане, в основном районе плодородия и садоводства страны, крайне востребовано, поскольку в случае массового распространения в этом регионе вирусных плодородию может быть нанесен серьезный урон, ощутимый для всей страны. Ситуацию усугубляет неконтролируемый завоз посадочного материала из-за границы и отсутствие в стране мониторинга вирусных и вирусных инфекций, отсутствие сертификационных схем посадочного материала [17].

Цель данного исследования заключалась в скрининге плодовых деревьев Алматинской области на присутствие PLMVd методом ОТ-ПЦР и генетическая характеристика выявленных изолятов. Результаты исследования позволят повысить эффективность контроля вирусных инфекций в стране.

Методы и материалы

Растительный материал. В работе были исследованы образцы листьев груш, вишен, персиков и абрикосов, собранных в Алматинской области в период сентября-октября 2023 года. Сбор растительного материала проведен в Карасайском, Илийском, Талгарском и Енбекшиказахском районах.

Выделение нуклеиновых кислот (НК). Выделение препаратов тотальных нуклеиновых кислот проводили с помощью ионного детергента ЦТАБ (цетилтриэтиламмоний бромид) [18]. Препараты тотальных нуклеиновых кислот выделяли из 100 мг листьев. Осадки, полученные после очистки и осаждения препаратов спиртом, растворяли в 100 мкл стерильной воды. Целостность РНК проверяли электрофоретически в 1% агарозном геле.

Реакция обратной транскрипции (ОТ). Для синтеза кДНК реакционная смесь объемом 5 мкл содержала следующие компоненты: 1,5 мкл раствора тотальных НК и 0,5 мкл смеси случайных гексамеров (Invitrogene). Пробирки прогревали 5 мин при 65°C и охлаждали во льду. Затем добавляли 2 мкл 5×буфера для обратной транскрипции (Thermo Scientific), 1мкл смеси дНТФ до конечной концентрации 1 мМ, 0,25 мкл (10 ед.) ингибитора рибонуклеаз (Thermo Scientific), 0,25 мкл (40 ед.) обратной транскриптазы Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) и воды до конечного объема 10 мкл. Реакционные смеси после предварительной выдержки в течение 10 мин на столе инкубировали в течение 30 мин при 50°C, далее в течение 5 мин проводили инактивацию фермента при 85°C с последующим охлаждением смеси во льду.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Амплификация кДНК генома PLMVd проводилась при участии пары специфичных олигонуклеотидов plmvr/plmvf и Pfu-ДНК-полимеразы (Thermo Scientific). 2мкл кДНК, полученной в ходе ОТ, использовали в качестве матрицы. Объем реакционной смеси составлял 40 мкл. ПЦР проводили на амплификаторе SimpliAmp (Applied Biosystems) при следующих параметрах: 2 мин при 95°C; 30 сек при 95°C, 30 сек при 58°C, 1 мин при 72°C – 35 циклов; 5 мин при 72°C. Продукты ПЦР анализировали в 1,8 % агарозном геле.

Молекулярное клонирование. Полученные в ходе ОТ-ПЦР ампликоны были клонированы в бактериальный вектор pBluescriptII SK с применением метода ТА-клонирования [19]. Лигирование проводили посредством T4 DNA Ligase (Thermo Scientific) по методике производителя. Трансформацию лигазной смесью компетентных клеток *Escherichia coli* штамма DH5 проводили посредством теплового шока (42°C 90 сек) с последующим посевом на среду LB (Luria-Bertani).

Секвенирование плазмидных ДНК по Сэнгеру в обоих направлениях осуществляли с использованием набора Big Dye® Terminator v.3.1 (Applied Biosystems) при участии универсальных праймеров M13+ и M13- по рекомендациям фирмы-изготовителя. Амплификацию проводили в термоциклере SimpliAmp (Applied Biosystems) в следующем температурном режиме: 96°C - 2 мин; (96°C - 20 сек, 50°C - 10 сек, 60°C – 4 мин) – 35 циклов; 60°C - 2 мин. Очистку реакционных смесей от не связавшихся терминаторов проводили методом осаждения продуктов амплификации 70% этанолом. Капиллярный электрофорез и анализ продуктов секвенирования проводили на генетическом анализаторе 310 (Applied Biosystems).

Сравнительный нуклеотидный анализ. Для разработки праймеров проводили выравнивание нуклеотидных последовательностей в программе MEGA-X и посредством онлайн-программы primerBLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Нуклеотидные последовательности выявленных двух казахстанских изолятов сравнивали с опубликованными зарубежными PLMVd в базе данных GenBank на сервере BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Статистический анализ выполнен в программе Excel (2010) с определением доверительного интервала 95 % (95% ДИ).

Результаты и обсуждение

Дизайн олигонуклеотидов. Для дизайна праймеров был предварительно осуществлен сравнительный компьютерный анализ размещенных на настоящий момент в базе данных GenBank (NCBI) нуклеотидных последовательностей геномов различных изолятов PLMVd. В качестве референтной последовательности служил геном изолята МК929593. Выравнивание 99 геномов проводили с помощью алгоритма программы BLAST. Используя средство просмотра множественного выравнивания последовательностей (MSA viewer), была получена консенсусная последовательность, на основе которой был осуществлен дизайн праймеров с учетом кольцевой природы виroidного генома с исключением вырожденных нуклеотидов. Специфичность каждой пары праймеров к геному вириода проверяли в онлайн программе Primer-Blast. Сконструированная пара праймеров plmf (5'-GGATTACGACGTCTACCCGG-3') и plmr (5'-CCAGTTTCTACGGCGGTACCTG-3') охватывает с 205 по 244 нуклеотиды генома изолята МК929593.

Сбор растительного материала. В работе были исследованы образцы листьев плодовых деревьев, собранных в четырех районах Алматинской области. Всего было собрано 83 образца, некоторые образцы были собраны с деревьев с характерными признаками вырождения, а именно усыханием большинства ветвей и отсутствием плодов (рис. 1). В ряде случаев наблюдалось скрученность листьев и позднее формирование листьев. Мозаичность окраски листьев, характерной для заражения PLMVd, у всех тестируемых образцов не наблюдалась.



Рисунок 1 – Внешний вид абрикоса (слева) и персика (справа), тестируемых на присутствие PLMVd

Выделение препаратов тотальных нуклеиновых кислот и их анализ. Препараты тотальных нуклеиновых кислот, выделенные из растительного материала с применением ЦТАБ, анализировали спектрофотометрически и электрофоретически в 1% агарозном геле (рис. 2). Как видно из рисунка, в образцах 1-10 и 12 18S рРНК и 28S рРНК представлены в виде двух четких дискретных полос, тогда как в образцах 11, 13 и 14 они отсутствуют. Это

указывает на присутствие деградации РНК в этих образцах. В дальнейшем образцы с деградированной РНК не анализировали, из 83 выделенных 69 образцов были отобраны для последующего изучения.

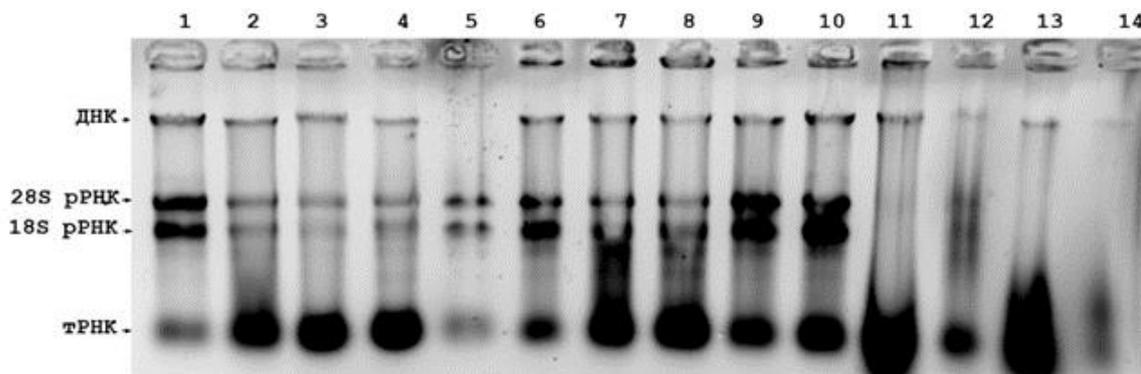


Рисунок 2 – Электрофоретический анализ в 1% агарозном геле выделенных препаратов НК

ОТ-ПЦР, клонирование ампликонов и секвенирование рекомбинантных вставок. Всего нами было проанализировано 69 образцов: 16 персиков, 25 абрикосов, 13 груш и 15 вишен. Проведенный скрининг выявил в двух образцах персика фрагмент ДНК, имеющий размер приблизительно 340 п.н. (рис. 3).

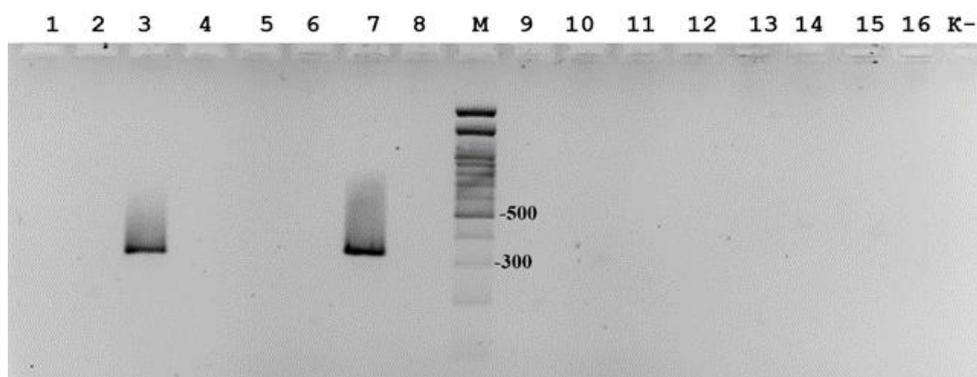


Рисунок 3 – Электрофорез продуктов ОТ-ПЦР образцов персика с праймерами plmf и plmr

ПЦР-продукты были очищены, к их 3'-концам был добавлен аденозин с помощью Taq-ДНК-полимеразы. Далее провели их клонирование в плазмиду pBluescriptII SK, предварительно линеризированной по сайту EcoV с последующим добавлением тимидина к 3'-концам векторной ДНК. При отборе рекомбинантных клонов использовали «бело-синий» тест в присутствии X-gal и ИПТГ. Из белых клонов были выделены плазмидные ДНК, наличие в них вставки было проверено методом рестрикции по фланкирующим сайтам HindIII/SacI, присутствующих в линкерной области вектора и отсутствующих в геноме PLMVd. Отобранные рекомбинантные плазмиды были секвенированы по методу Сэнгера в обоих направлениях (с 5'- и с 3'-концов) в присутствии универсальных праймеров (чтобы перекрыть весь клонированный участок). Оба изолята имели размер генома 338 нуклеотидов.

Сравнительный BLAST анализ нуклеотидных последовательностей. Секвенированные нуклеотидные последовательности казахстанских изолятов сравнивали с геномами изолятов PLMVd из базы данных NCBI на сервере BLAST. Казахстанские изоляты по нуклеотидному составу оказались гомологичны друг другу на 95,5%, гомология с зарубежными изолятами составила 81-96%. Наименьшее сходство было выявлено с изолятом PLMVd персика из Южной Кореи (KY355170), а наибольшее сходство - с изолятом абрикоса японского из Китая (OL854072). Следующие наиболее близкими генетически являлись изоляты MK212063,

EU888598, MW928680, MW298680 и EF151297, обнаруженные соответственно в Испании, Мексике, Польше и Сербии.

Превалентность РНК PLMVd в персиках (основной хозяин данного вириода) составила 12,5% (95% ДИ: 1,6-38,4%). Это достаточно высокий показатель, указывающий на то, что в Алматинской области фиксируется опасная эпидемиологическая ситуация по этому карантинному инфекционному агенту. Требуется проведение масштабных мониторинговых исследований вириодных инфекций плодовых и косточковых культур на регулярной основе в юго-восточном регионе Казахстана.

Следует отметить, что оба казахстанских вириода были выявлены в листьях с деревьев персика, проявлявших выраженные клинические симптомы, характерные для PLMVd: скрученные листья, позднее формирование листьев, повреждение стволов. Одно из пораженных деревьев погибло через полгода после сбора образцов. Таким образом, даже проведение визуального осмотра садов может позволить локализовать распространение вириодной инфекции в рискованных по болезни районах. Один из изолятов выявлен в районе города Алматы, а второй – в Карасайском районе (с. Алмалыбак).

Практическое применение полученных результатов. Клонированные полные геномы PLMVd в составе полученных генетических конструкций могут быть использованы в качестве положительных контролей (в качестве матриц) для разработки отечественных тест-систем, позволяющих выявлять генетический материал этого вириода в растительном материале. Пара праймеров, разработанная в ходе настоящей исследовательской работы, может быть использована для выявления РНК PLMVd как методом классической ОТ-ПЦР, так и методом количественной ОТ-кПЦР в реальном времени. Установление нуклеотидной последовательности полных геномов казахстанских изолятов PLMVd позволило установить подтип циркулирующего инфекционного агента, что позволит повысить эффективность проводимого молекулярного мониторинга вириодных инфекций плодовых деревьев на территории Казахстана.

Выводы

Для проведения скрининга фруктовых деревьев в РК на присутствие вириода PLMVd нами был разработан набор праймеров для проведения ОТ-ПЦР. Разработанные праймеры показали свою эффективность, позволив выделить два различных представителя PLMVd, нуклеотидная гомология которых не превышала 95,5%. Это позволяет использовать разработанную пару праймеров для проведения молекулярно-генетического мониторинга данного вириода.

В результате проведенных исследований впервые на территории РК, в частности в Алматинской области, в двух образцах персика был выявлен указанный карантинный патоген (PLMVd). Были установлены нуклеотидные последовательности полноразмерных геномов обоих изолятов и проведен их сравнительный генетический анализ с уже известными изолятами.

Подобные исследования необходимо проводить во всех регионах республики, особенно в южных, таких как Туркестанская и Джамбульская области, где особенно интенсивно развивается сельское хозяйство и имеются благоприятные климатические условия. Выбраковка зараженных растений предотвратит дальнейшее распространение данного патогена через саженцы и инструменты, используемые при обрезке и прививке. Такие исследования так же имеют научный интерес, так как способствуют расширению знаний о географическом ареале распространения вириодов и их генетическом разнообразии.

Благодарность: Работа выполнена при финансовой поддержке КН МНВО РК в рамках научно-технической программы BR21881942 "Разработка биотехнологических подходов для контроля фитопатогенов с целью повышения продуктивности сельскохозяйственных культур" на 2023-2025 гг.

Список литературы

1. Tsagris E.M., Martínez de Alba A.E., Gozmanova M., Kalantidis K. Viroids. *Cell Microbiology*. – 2008. - Vol. 10. – P. 2168-79. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01231.x.
2. Ortolá B., Daròs J.-A. Viroids: Non-Coding Circular RNAs Able to Autonomously Replicate and Infect Higher Plants // *Plants. Biology (Basel)*. – 2023. – Vol. 12. – P. 172. doi: 10.3390/biology12020172.
3. Надирова Л.Т., Станбекова Г.Э., Бейсенов Д.К., Искаков Б.К. Молекулярная диагностика вироида веретеновидности клубней картофеля в Республике Казахстан // *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*. – 2018. – №3. doi: 10.11134/btp.3.2016.5.
4. Надирова Л.Т., Станбекова Г.Э., Искаков Б.К. Молекулярная диагностика вироидов плодовых растений // *Материалы междунар. конференции «Современные проблемы молекулярной и клеточной биологии, биохимии и биотехнологии»*. г. Алматы, 2009 г. – С. 46.
5. Bussiere F., Quellet J., Cote F., Levesque D. and Perreault J.P. Mapping in solution shows the peach latent mosaic viroid to possess a new pseudoknot in a complex, branched secondary structure // *J. Virology*. – 2000. – Vol. 74. – P. 2647–2654. doi: 10.1128/jvi.74.6.2647-2654.2000.
6. Di Serio F., Flores R., Verhoeven J. T. J., Li S.-F., Pallás V., Randles J. W., Owens R. A. Current status of viroid taxonomy // *Archives of Virology*. - 2014. – Vol. 159. – P. 3467–3478. doi: 10.1007/s00705-014-2200-6.
7. Desvignes J.C. Different symptoms of the peach latent mosaic // *Acta Phytopathologica Academia Scientiae Hungariae*. – 1980. – Vol. 15. - P. 183-190. doi:17660/ActaHortic.1981.94.24.
8. Ambrós S., Llácer G., Desvignes J.C., Flores R. Peach latent mosaic and pear blister canker viroids: detection by molecular hybridization and relationships with specific maladies affecting peach and pear trees // *Acta Horticulturae*. – 1995. – Vol. 386. - P. 515–521. doi: 10.17660/actahortic.1995.386.74.
9. Ambrós S., Hernández C., Desvignes J.C., Flores R. Genomic structure of three phenotypically different isolates of peach latent mosaic viroid: implications of the existence of constraints limiting the heterogeneity of viroid quasispecies // *Journal of Virology*. – 1998. –Vol.7. – P. 397-406. doi: 10.1128/JVI.72.9.7397-7406.1998.
10. Ragozzino E., Faggioli F., Barba M. Development of a one tube-one step RT-PCR protocol for the detection of seven viroids in four genera: Apscaviroid, Hostuviroid, Pelamoviroid and Pospiviroid // *J. Virol. Methods*. – 2004. - Vol.121. – P. 25–29. doi:10.1016/j.jviromet.2004.05.012.
11. Parisi O., Lepoivre P., Jijakli M.H. Development of a quick quantitative real-time PCR for the in vivo detection and quantification of peach latent mosaic viroid // *Plant Disease*. – Vol. 95. – P. 137-142. doi: 10.1094/PDIS-07-10-0512.
12. Приходько Ю.Н., Живаева Т.С., Лозовая Е.Н., Шнейдер Ю.А., Каримова Е.В. Разработка методов диагностики вироида латентной мозаики персика (PLMVd) // *Фитосанитария. Карантин растений* – 2021. – №3. – С.47-57. doi:10.69536/FKR.2021.27.95.001.
13. Luigi M., Faggioli F. Development of quantitative real-time RT-PCR for the detection and quantification of peach latent mosaic viroid // *Eur. J. Plant Pathol.* – 2011. Vol. 95. – P. doi: 137–142. 10.1007/s10658-010-9738-2.
14. Boubourakas I.N., Fukuta S., Kyriakopoulou P.E. Sensitive and rapid detection of peach latent mosaic viroid by the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification // *J. Virol. Methods*. - 2009. Vol. 160. – P. 63–68. doi:10.1016/j.jviromet.2009.04.021.
15. Lee H.J., Kim H.J., Lee K., Jeong R.D. Rapid detection of peach latent mosaic viroid by reverse transcription recombinase polymerase amplification // *Mol Cell Probes*. – 2020. Vol. 53. –P. 101627. doi: 10.1016/j.mcp.2020.101627.
16. Zhang Y., Yin J., Jiang D., Xin Y., Ding F., Deng Z., Wang G., Ma X., Li F., Li G., Li M., Li S., Zhu S. A universal oligonucleotide microarray with a minimal number of probes for the detection and identification of viroids at the genus level // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, 5 e64474. doi: 10.1371/journal.pone.0064474.

17. Долгих С., Кабылбекова Б. Перспективы производства сертифицированного посадочного материала плодовых культур в казахстане // *Izdenister Natigeler.* -2023.- №2 (98). - С. 133–143. doi: 10.37884/2-2023/1.
18. Li R., Mock R., Huang Q., Abad J., Hartung J., Kinard G. A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens // *J Virol Methods.* – 2008. – Vol. 154. – P. 48-55. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.09.008.
19. Zhou M-Y., Gomez-Sanchez C.E. Universal TA Cloning // *Current Issues in Molecular Biology.* – 2000. – Vol. 2. – P.1-7. doi.org/10.21775/cimb.002.001.

References

1. Tsagris E.M., Martínez de Alba A.E., Gozmanova M., Kalantidis K. Viroids // *Cell Microbiology.* – 2008. - 10. – P. 2168-79.
2. Flores R., Gas M., Molina Serrano D., Nohales M´A., Carbonell A., Gago S., De la Peña M., J Dar`os J.A. Viroid replication: rolling-circles, enzymes and ribozymes // *Viruses.* -2009. - Vol. 1. – P. 317–334.
3. Nadirova L.T., Stanbekova G.E., Bejsenov D.K., Iskakov B.K. Molekulyarnaya diagnostika viroida veretenovidnosti klubnej kartofelya v Respublike Kazakhstan // *Eurasian Journal of Applied Biotechnology.* – 2018. – №3.
4. Nadirova L.T., Stanbekova G.E., Iskakov B.K. Molekulyarnaya diagnostika viroidov plodovykh rastenij // *Materialy mezhdunar. konferentsii «Sovremennye problemy molekulyarnoj i kletchoj biologii, biokhimii i biotekhnologii».* Almaty, 2009. – S. 46.
5. Bussiere F., Quellet J., Cote F., Levesque D. and Perreault J.P. Mapping in solution shows the peach latent mosaic viroid to possess a new pseudoknot in a complex, branched secondary structure // *J. Virology.* – 2000. – Vol. 74. – P. 2647–2654.
6. Di Serio F., Flores R., Verhoeven J. T. J., Li S.-F., Pallás V., Randles J. W., Owens R. A. Current status of viroid taxonomy // *Archives of Virology.* - 2014. – Vol. 159. – P. 3467–3478.
7. Desvignes J.C. Different symptoms of the peach latent mosaic // *Acta Phytopathologica Academia Scientiae Hungariae.* – 1980. – Vol. 15. - P. 183-190.
8. Ambrós S., Llácer G., Desvignes J.C., Flores R. Peach latent mosaic and pear blister canker viroids: detection by molecular hybridization and relationships with specific maladies affecting peach and pear trees // *Acta Horticulturae.* – 1995. – Vol. 386. - P. 515–521.
9. Parisi O., Lepoivre P., Jijakli M.H. Development of a quick quantitative real-time PCR for the in vivo detection and quantification of peach latent mosaic viroid // *Plant Disease.* – Vol. 95. – P. 137-142.
10. Ambrós S., Hernández C., Desvignes J.C., Flores R. Genomic structure of three phenotypically different isolates of peach latent mosaic viroid: implications of the existence of constraints limiting the heterogeneity of viroid quasispecies // *Journal of Virology.* – 1998. –Vol.7. – P. 397-406..
11. Ragozzino E., Faggioli F., Barba M. Development of a one tube-one step RT-PCR protocol for the detection of seven viroids in four genera: Apscaviroid, Hostuviroid, Pelamoviroid and Pospiviroid // *J. Virol. Methods.* – 2004. - Vol.121. – P. 25–29.
12. Prikhod'ko YU.N., ZHivaeva T.S., Lozovaya E.N., SHnejder YU.A., Karimova E.V. Razrabotka metodov diagnostiki viroida latentnoj mozaiki persika (PLMVd) // *Fitosanitariya. Karantin rastenij* - 2021. - No. 3. - S.47-57.
13. Luigi M., Faggioli F. Development of quantitative real-time RT-PCR for the detection and quantification of peach latent mosaic viroid // *Eur. J. Plant Pathol.* – 2011. Vol. 95. – P.
14. Boubourakas I.N., Fukuta S., Kyriakopoulou P.E. Sensitive and rapid detection of peach latent mosaic viroid by the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification // *J. Virol. Methods.* - 2009. Vol. 160. – P. 63–68.
15. Lee H.J., Kim H.J., Lee K., Jeong R.D. Rapid detection of peach latent mosaic viroid by reverse transcription recombinase polymerase amplification // *Mol Cell Probes.* – 2020. Vol. 53. –P. 101627.

16. Zhang Y., Yin J., Jiang D., Xin Y., Ding F., Deng Z., Wang G., Ma X., Li F., Li G., Li M., Li S., Zhu S. A universal oligonucleotide microarray with a minimal number of probes for the detection and identification of viroids at the genus level // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, 5, e64474
17. Dolgikh S., Kabyzbekova B. Perspektivy proizvodstva sertifikirovannogo posadochnogo materiala plodovykh kul'tur v Kazakhstane // Izdenister Natigeler. -2023.- №2 (98). - S. 133–143.
18. Li R., Mock R., Huang Q., Abad J., Hartung J., Kinard G. A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens // J. Virol. Methods. – 2008. – Vol. 154. – P. 48-55.
19. Zhou M-Y., Gomez-Sanchez C.E. Universal TA Cloning // Current Issues in Molecular Biology. – 2000. – Vol. 2. – P.1-7.

Л.Т. Надирова*^{1,2}, Г.Е. Станбекова¹, Б.Қ. Ысқақов¹, А.В. Жигайлов¹

¹М.А. Айтхожин атындағы молекулалық биология және биохимия институты, Алматы, Қазақстан, leila.nadirova@gmail.com*

²Әл-Фараби атындағы ҚазҰУ, Алматы, Қазақстан, gulshanst@yahoo.com, bulat.iskakov@mail.ru, andrzhjglov@mail.ru

КТ-ПТР АРҚЫЛЫ ШАБДАЛЫ ЖАСЫРЫН МОЗАИКАЛЫҚ ВИРОИДТЫ (PLMVd) ДИАГНОСТИКАСЫ

Аңдатпа

Вироидтар, өсімдіктердің кішкентай қоздырғыштары бүкіл әлем бойынша ауыл шаруашылығына айтарлықтай экономикалық шығын әкеледі. Қазіргі уақытта олардың әрі қарай таралуына жол бермеу үшін дер кезінде диагностикалауға көп көңіл бөлінуде. Қазақстан Республикасының аумағында алғаш рет ЕАЭО елдерінің аумағында карантиндік қоздырғыштар тізіміне енгізілген шабдалы жасырын мозайкасының қоздырғышы PLMVd viroid молекулярлық диагностикасы жүргізілді. Алматы облысынан жиналған алмұрт, шие, шабдалы және өрік жапырақтарының үлгілеріне вироидтың болуына талдау жүргізілді. Біз әзірлеген спецификалық праймерлердің қатысуымен кері транскрипциядан кейін полимеразды тізбекті реакциямен (КТ-ПТР) Алматы қаласы мен Алматы облысының Қарасай ауданында өсетін шабдалы дақылдың екі үлгісінде ұзындығы 338 жұп нуклеотидті ДНҚ фрагменті анықталды. ПТР өнімдері бактериялық векторға клондалды және олардың нуклеотидтер тізбегі кейіннен анықталды. Сэнгер реттілігі және BLAST талдауы зерттелген үлгілерде PLMVd нуклеин қышқылының болуын растады. Жергілікті PLMVd изоляттарының нуклеотидтер тізбегінің салыстырмалы талдауы олардың бір-біріне ұқсастығын 95,5% және басқа елдердің жарияланған нұсқаларымен 81-96% көрсетті.

Кілт сөздер: viroid, PLMVd, КТ-ПТР, клондау, секвенирлеу, нуклеотидтік талдау.

L.T. Nadirova*^{1,2}, G.E. Stanbekova¹, B.K. Iskakov¹, A.V. Zhigailov¹

¹M.A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Almaty, Almaty region, Kazakhstan, leila.nadirova@gmail.com*

²Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan, gulshanst@yahoo.com, bulat.iskakov@mail.ru, andrzhjglov@mail.ru

DIAGNOSIS OF PEACH LATENT MOSAIC VIROID (PLMVd) BY RT-PCR

Abstract

Viroids, the smallest plant pathogens, cause significant economic damage to agriculture worldwide. Currently, much attention is paid to their timely diagnostics in order to prevent their further spread. For the first time in the Republic of Kazakhstan, molecular diagnostics of the PLMVd viroid, the causative agent of latent mosaic of peach, included in the list of quarantine pathogens in

the territory of the EAEU countries, was carried out. Samples of pear, cherry, peach and apricot leaves collected in the Almaty region were analyzed for the presence of the viroid. Reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR) in the presence of specific primers developed by us, revealed a DNA fragment of 338 nucleotide pairs in two peach samples growing in the city of Almaty and the Karasai district of the Almaty region. PCR products were cloned into a bacterial vector with subsequent determination of their nucleotide sequence. Sanger sequencing and BLAST analysis confirmed the presence of PLMVd nucleic acid in the samples. Comparative analysis of the nucleotide sequences of local PLMVd isolates showed 95.5% similarity between them and 81-96% similarity with published variants from other countries.

Key words: viroid, PLMVd, RT-PCR, cloning, sequencing, nucleotide analysis.

МРНТИ 68.33.29

DOI <https://doi.org/10.37884/3-2024/14>

*М.Бейсенбаева*¹, А.Жанпарова¹, Д.Сыдық², К.О.Караева¹, М.Кусаинова¹, А.Закиева³*

¹*Қаза құлттық аграрлық зерттеу университеті, Алматы, Қазақстан Республикасы*
mm0825@mail.ru, aigul7171@inbox.ru, karliga_89@mail.ru, mairakussainova@gmail.com*

²*«Оңтүстік-батыс мал және өсімдік шаруашылығы ғылыми-зерттеу институты»*
ЖШС, Шымкент, Қазақстан sydykdosymbek@mail.ru

³*«Семей қаласының Шәкәрім атындағы университеті» КеАҚ, Семей, Қазақстан*
Республикасы araisyly@mail.ru

МАЙБҰРШАҚ ЕГІСТІГІ ЖАҒДАЙЫНДА КӘДІМГІ СҰР ТОПЫРАҚТАРДЫҢ ЫЛҒАЛ ҚОРЫ ЖӘНЕ СУ- ФИЗИКАЛЫҚ ҚАСИЕТТЕРІНЕ СУАРУ РЕЖИМІН ОҢТАЙЛАНДЫРУДЫҢ ӘСЕРІ

Аннотация

Мақалада Қазақстанның оңтүстіктігінің құрғақ және ыстық климатында майбұршақ дақылының өсуі мен дамуының әртүрлі фазаларында минералды, микроминералды тыңайтқыштар мен өсу стимуляторларының әртүрлі нормаларымен үйлестіре отырып, суарудың және отырғызудың нақты мерзімдері, саны және схемасы эксперименталды түрде анықталды. Зерттеу барысында тәжірибе танабының екі метрлік тереңдік (0-200 см) топырақтың су және физикалық құрлымы кестеде келтірілген 2019 жылғы зерттеулер нәтижесінде алынған деректерге сәйкес топырақ қуыстылығы 41,8-42,8% құрады, шекті гигроскопиялық көрсеткіші 4,56-4,70 %, көлемдік массасы жер жырту қабатында 1,47-1,54 г/см³ деңгейінде өзгергендігі анықталды. Майбұршақтың вегетациялық өсіп-даму кезеңінде суару режимін 70-70-70 % ең төменгі ылғал сыйымдылығы деңгейінде қалыпты ұстау үшін 8 рет суарылды. Сол кезеңдегі ауа райына байланысты кезекті суару 14-17 тәуліктен соң жүргізіліп отырды. Жалпы жұмсалған ағын су мөлшері 5450 м³/га құрады. Топырақ ылғалдылығын 70-80-70% ең төменгі ылғал сыйымдылығы деңгейінде ұстап тұру үшін майбұршақ дақылының өсіп даму кезеңінде тоғыз рет суарылды- жалпы жұмсалған ағын су мөлшері 4600 м³/га болды. Ал, майбұршақтың вегетациялық кезеңдерінде жиналған ылғал қорының жинақталуы бойынша бір метр тереңдіктегі ылғал мөлшері 190,6-84,1 мм аралығында ауытқыды.

Кілт сөздер: *Суару режимі, суару мерзімі, суару нормалары, тыңайтқыштар, азот, микротыңайтқыштар, өсу стимуляторы, ең төменгі ылғал сыйымдылығы, көлемдік салмақ*

Кіріспе

Қазақстанда алғаш рет 1975 жылы ауыл шаруашылық өндірісінде майбұршақ 2670 га алқапқа егілді. Келесі жылы майбұршақ егісі 4100га, ал 1977 жылы 4500 гектарға егілді. Соңғы