

әдістерінің комбинациясына негізделген. Оңтүстік және оңтүстік-шығыс Қазақстанның коммерциялық бақтарынан жиналған 49 сынаманың ішінде нақты уақыт режиміндегі RT-ПТР ACLSV 18,4%, ANVd 10,2% және ASPV 51,02% оң нәтижелерді анықтады. Алынған нәтижелерді сауықтырылған және вируссыз бастапқы материалын алу үшін пайдалануға болады. Бұл қазақстандық нарықты жоғары сапалы отандық алма ағашын отырғызатын материалмен қамтамасыз ету мәселесін шешеді.

**Кілт сөздер:** алма, телу, сорт, вирустық аурулар, вироид, ACLSV, ASPV, ANVd, РНК, КТ-НУ-ПТР.

МРНТИ 68.35.53

DOI <https://doi.org/10.37884/3-2024/12>

К.П.Аубакирова\*, Ж.Н.Бақытжанова, Л.С. Ерболова, А.Рахатқызы, Н.Н. Галиакпаров

*Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина,  
г. Алматы, Казахстан, [karla\\_78@mail.ru](mailto:karla_78@mail.ru)\*, [bakytzhanovazhibek@gmail.com](mailto:bakytzhanovazhibek@gmail.com),  
[yerbolova.laura7@gmail.com](mailto:yerbolova.laura7@gmail.com), [akbotarahatkyzy1@gmail.com](mailto:akbotarahatkyzy1@gmail.com), [nurbol.gal@gmail.com](mailto:nurbol.gal@gmail.com)*

## УЛУЧШЕННЫЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ РНК ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСОВ ПЛОДОВО-ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР

### Аннотация

Эффективное выделение высококачественной РНК является важным этапом выявления РНК-вирусов растений молекулярными методами. Выделение РНК из листьев винограда, яблони и других плодовых растений проблематично из-за присутствия полисахаридов, полифенолов и других соединений, которые связываются с РНК или осаждаются совместно с ней. В данной работе оптимизирован протокол на основе цетилтриметиламмония бромида (СТАВ) для выделения РНК из листьев винограда, яблони, абрикоса, сливы и грецкого ореха. Увеличена концентрация РVP, 2-mercaptoethanol и СТАВ. Для каждой культуры оптимизировано время инкубации с экстракционным СТАВ буфером при температуре 65 °С. Для листьев винограда и яблони оптимальная время инкубации – 40 минут, для листьев абрикоса – 20 минут, для листьев сливы и ореха – 30 минут. Сравнительное исследование трех различных методов экстракции РНК показало, что оптимизированный протокол обеспечивает наиболее высокое качество и количество выделенной РНК, как подтверждено электрофорезом и спектрофотометрическим анализом. Выделенная с использованием нашего протокола РНК пригодна для последующих молекулярных анализов, таких как синтез кДНК и ПЦР, что демонстрирует его пригодность для выявления вирусов в различных видах плодовых деревьев, включая виноград, яблоню, абрикос, сливу и грецкий орех. Модифицированный метод рекомендуется для использования в дальнейших исследованиях по детекции РНК-вирусов растений с помощью ПЦР.

**Ключевые слова:** виноград, яблоня, абрикос, слива, грецкий орех, выделение РНК, вирусы плодовых растений, СТАВ.

### Введение

Метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) широко используется для детекции и идентификации вирусов растений благодаря его высокой специфичности и чувствительности [1]. Однако успешное применение ОТ-ПЦР для выявления РНК-вирусов растений не возможно без эффективного выделения высококачественной РНК. На качество и количество выделяемой РНК большое влияние оказывают методы экстракции и виды растений [2]. Листья большинства фруктовых деревьев содержат полисахариды и полифенольные соединения [3], которые ингибируют реакции обратной транскрипции и ПЦР

[4,5]. Для обнаружения вирусов в растениях были разработаны различные методы выделения РНК с использованием различных денатурирующих органических растворителей (фенол и хлороформ), восстановителей ( $\beta$ -меркаптоэтанол и дитиотреитол) или денатурирующих агентов (соли изотиоцианата гуанидиния) и различных детергентов, таких как додецилсульфат натрия (SDS), цетилтриметиламмоний бромид (СТАВ) или саркозил [6-8]. Методы, основанные на тризоле и СТАВ, наиболее широко используются для выделения растительной РНК [9-11]. Однако ТРИзол не подходит для выделения высококачественной РНК из некоторых видов древесных растений (например, персика, груши и виноградной лозы) [12,13]. Ряд авторов модифицировали некоторые из этих методов с целью повышения их эффективности для конкретных видов растений [14,15]. Коммерческие наборы для выделения растительной РНК дорогостоящие, и малопригодны для растительных тканей с большим содержанием полифенольными и полисахаридными соединениями [16,17]. Целью настоящей работы является оптимизация метода выделения РНК из растительных тканей растений плодово-ягодных культур богатых полисахаридами полифенольными соединениями. Представлен метод, который обеспечивает получение РНК достаточного качества для обнаружения вирусов с помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Усовершенствованный протокол экстракции сравнился с двумя другими методами экстракции РНК по надежности, трудоемкости и стоимости.

### **Методы и материалы**

Свежие листья винограда, яблони, абрикоса, сливы и ореха были собраны в различных регионах Казахстана. Абрикос и слива были собраны в крестьянских хозяйствах Уйгурского района Алматинской области. Орех, яблоня и виноград были собраны в Туркестанской области. Все собранные образцы свежих листьев были сохранены в морозильной камере при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Для подбора оптимального метода выделения РНК из листьев плодовых культур были протестированы три протокола выделения.

**Протокол А** – разработан *Dellaporta et al.* [18]. 100 мг листьев гомогенизировали в 1 мл буфера состоящего из: 10% SDS, 50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 8.0, непосредственно перед использованием в буфер добавлялись 20 мкл/мл  $\beta$ -mercaptoethanol и 10 мг на мл PVP. Гомогенат инкубировался в водяной бане при  $65^{\circ}\text{C}$  45 минут. По истечении 45 минут, к гомогенату добавлялся ацетат натрия до конечной концентрации 1 M и экстракт инкубировался во льду 20 минут. Гомогенат центрифугировался для удаления дебриса и РНК осаждалась изопропанолом. Осадок РНК растворялась в 100 мкл бидистиллированной воде.

**Протокол Б** – модифицированный протокол разработанной *Doyle and Doyle* [19]. 100 мг листьев гомогенизировали в ступке в присутствии 1 мл буфера (100 mM Tris-HCl pH=8.0; 20mM EDTA, pH=8.0; 1.4M NaCl, 2% СТАВ, PVP и 2-mercaptoethanol добавлялись до конечной концентрации 2% и 0.2 %, соответственно, перед использованием). Гомогенат инкубировался 25 минут при  $65^{\circ}\text{C}$ , экстрагировался хлороформом и РНК осаждалась изопропанолом. РНК растворялась в 100 мкл бидистиллированной воде.

**Протокол В** – измененный нами протокол, разработанный *Doyle and Doyle* [19]. В первоначальный протокол СТАВ было внесено несколько изменений. Все этапы центрифугирования проводились при температуре  $4^{\circ}\text{C}$ . Концентрации СТАВ x2, PVP и 2-mercaptoethanol были увеличены в 2 раза. 100 мг листьев растирались в ступке в присутствии 1 мл буфера (200 mM Tris-HCl pH=8.0; 40mM EDTA, pH=8.0; 2.8M NaCl, 4% СТАВ, PVP и 2-mercaptoethanol добавлялись до конечной концентрации 4% и 0.4 %, соответственно, перед использованием). Гомогенат инкубировался при  $65^{\circ}\text{C}$  в течение 20-40 минут, время инкубации для каждой культуры разные и затем экстрагировался хлороформом. К водной фазе добавлялись 0,5 объема 5M хлорида натрия и 2 объема этанола. Смесь инкубировалась при  $-20^{\circ}\text{C}$  15-20 минут, центрифугировалась 15 минут при 13000 g. Осадок РНК промывался 75% этанолом и растворялась в воде. РНК растворялась в 60 мкл бидистиллированной воде.

Проверку качества и количества РНК проводили путем электрофореза в 1.4 % агарозном геле и спектрофотометрически на Nanodrop (Nano 500, ALLSHENG).

### **Результаты и обсуждение**

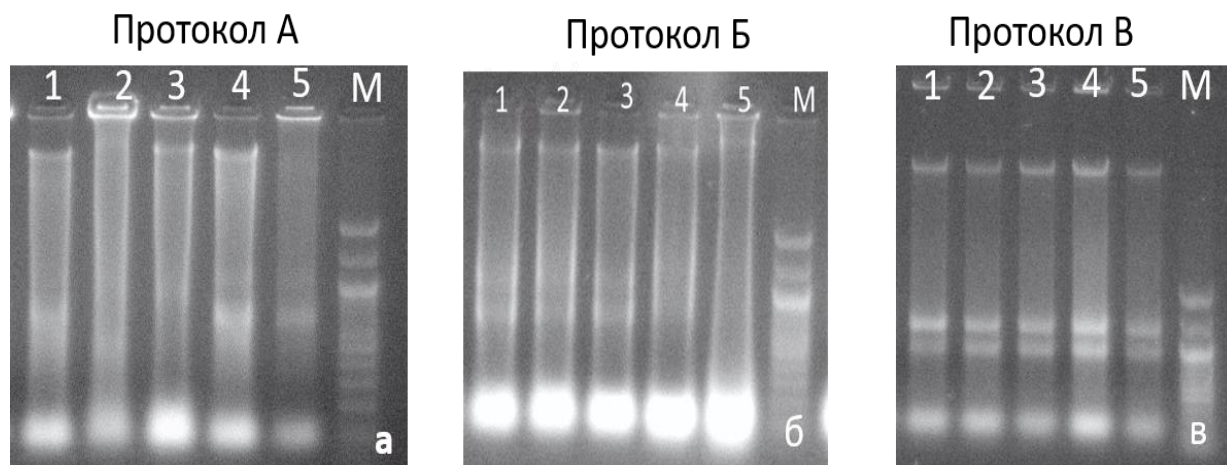
Выделение высококачественной РНК из тканей древесных и многолетних растений является особенно сложной задачей из-за высокой концентрации полисахаридов, полифенолов и других вторичных метаболитов. Фенольные соединения связывают белки и нуклеиновые кислоты, образуя высокомолекулярные комплексы; полисахариды имеют тенденцию осаждаться совместно с РНК в присутствии спиртов, кроме того, ингибируют многие ферментативные реакции. В настоящее время существует несколько различных коммерческих наборов для выделения РНК, однако их высокая стоимость за образец ограничивает возможности проведения исчерпывающего анализа. Кроме того, количество и качество РНК часто различаются у представителей разных родов, а иногда даже у разных видов одного рода или в разных тканях растений. Наличие некоторых клеточных компонентов в экстрагированных образцах РНК могут подавляться последующие молекулярные реакции.

В методе с использованием СТАВ, лизис мембран осуществляется СТАВ – детергентом, который содержится в буфере для экстракции РНК. При взаимодействии клеточных мембран с буфером для экстракции, содержащим детергент. СТАВ захватывает липиды и белки, освобождая нуклеиновые кислоты. Меркаптоэтанол в составе СТАВ буфере осаждают белки и полисахариды как нерастворимый комплекс. Также меркаптоэтанол разрушает дисульфидные мостики, в том числе и в белках, с нарушением их третичной и четвертичной структуры и действует как биологический антиоксидант, ингибируя окислительные процессы, которые напрямую повреждают РНК. Поскольку наличие дисульфидных мостиков поддерживает стабильность ферментов нуклеаз, меркаптоэтанол элиминирует активность этих соединений, освобождаяемых при лизисе клеток.

С целью сокращения времени и затрат на экстракцию без снижения качества и выхода РНК, мы разработали протокол СТАВ, внося несколько изменений в первоначальную процедуру. Для протокола СТАВ была увеличена концентрация РVP 4 %, 2-mercaptoethanol 0,5% и концентрация экстракционного буфера до 2,0 %, чтобы повысить его эффективность в улавливании фенольных соединений. Для каждой культуры оптимизировали время инкубации с экстракционным СТАВ буфером при температуре 65 °С. Для винограда и яблони время инкубации – 40 минут, оптимальная время инкубации для абрикоса – 20 минут. Слива и Орех – 30 минут. Концентрация раствора NaCl была увеличена до 5 М и в смесь надосадочной жидкости добавляли 0,5 объема 5М хлорида натрия и 2 объема 96 % этанола, далее инкубировали при -20°С 15 минут перед центрифугированием вместо ночной инкубации при 4°С. Высокомолярный раствор NaCl дифференцированно осаждают РНК из смеси с ДНК, увеличивает выход РНК и способствует осаждению более крупных транскриптов по сравнению с более мелкими. РНК осаждали центрифугированием 15 минут при 13000 g. Осадок РНК промывали 75% этанолом и растворяли в 60 мкл бидистиллированной воде.

Для полной уверенности в подтверждении качества выделенной РНК проводили электрофорез в агарозном геле с этидиумом бромидом. Выделенные с помощью 3 протоколами РНК проверяли на электрофорезе в агарозном геле с этидиумом бромидом. На рисунке 1 представлены результаты электрофореза образцов РНК, выделенных из свежих листьев винограда, яблони, абрикоса, сливы и грецкого ореха с использованием трех протоколов А, Б, В.

На рисунке 1- (в) *протокол В* четко видны две полосы, верхний является 28S, а нижний 18S рибосомальными РНК и их четкое разделение и целостность свидетельствует о высоком качестве РНК. Однако другие методы давали слабые полосы РНК с большим количеством примесей в лунке для геля и размытым фоном во время обработки (рисунок 1а-б). Образцы РНК, выделенные по протоколу А, были окрашены в желтоватый или темный цвет, что, вероятно, было связано с быстрым окислением экстракта.



Протоколы: А. модифицированный Dellaporta et al. (1983); Б. модифицированный Doyle and Doyle (1990); В. Измененный нами модифицированный Doyle and Doyle, 1990; №1 - виноград; №2 – яблоня; №3 – абрикос; №4 – слива; №5 – грецкий орех.

**Рисунок 1** – Электрофореграмма в агарозном геле образцов РНК, выделенных с использованием трех протоколов А, Б, В.

Таблице 1 представлены спектрофотометрические данные отношения поглощения при 260/280 нм и A260/A230 рассчитанные количества выделенной РНК из различных образцов. Было отмечено, что во всех протестированных различных плодовых образцах РНК, выделенная с использованием СТАВ протокол В, была относительно менее загрязнена, на что указывают соотношения A260/A280 в диапазоне от 1,87 до 1,96 и соотношений A260/A230, варьирующихся от 1,90 до 2,13 соответственно, с выходом РНК в диапазоне от 650 до 824 нг/мкл образца (таблица 1). Это показывает, что извлеченная РНК не содержит белковых примесей, органических растворителей и других вторичных продуктов по сравнению с другими методами выделения РНК.

**Таблица 1** Сравнительная оценка соотношений A260/A280 и A260/A230 РНК, выделенной с тремя методами из листьев винограда, яблони, абрикоса, сливы и грецкого ореха, с использованием спектрофотометра Nano-500 для оценки качества РНК.

Протокол	Образцы	Отношение поглощения A 260/280	Отношение поглощения A 260/230	Выход РНК нг/мкл
Протокол А (Dellaporta et al., 1983)	Виноград	1,70	1,74	69
	Яблоня	1,62	1,51	16
	Абрикос	1,58	1,45	23
	Слива	1,71	1,75	112
	Грецкий орех	1,75	1,72	84
Протокол Б (модифиц. Doyle and Doyle, 1990)	Виноград	1,74	1,76	89
	Яблоня	1,70	1,68	51
	Абрикос	1,68	1,55	46
	Слива	1,56	1,32	18
	Грецкий орех	1,30	1,09	21
Протокол В (измененный нами Doyle and Doyle, 1990)	Виноград	1,94	1,99	680
	Яблоня	1,96	2,0	715
	Абрикос	1,95	1,95	675
	Слива	1,89	2,13	824
	Грецкий орех	1,87	1,90	650

### **Выводы**

Таким образом, полученная высококачественная РНК было продемонстрировано, что этот метод подходит для последующих применений, таких как синтез кДНК, амплификация генов и ОТ-ПЦР-выявлении вирусы и виroidы различных видов плодовых деревьев. Метод также оказался эффективным и универсальным при выделении РНК из различных плодовых культур такие как виноград, яблоня, абрикос, слива и грецкий орех. Измененный нами модифицированный метод СТАВ *протокол В* - это надежный и хорошо воспроизводимый метод выделения РНК из различных плодовых растений, богатые полисахаридами, полифенолами и другими вторичными метаболитами, которые связываются с РНК или осаждаются совместно с ней.

Сравнительная оценка методов выделения РНК из различных плодовых растений такие как виноград, яблоня, абрикос, слива и грецкий орех показала, что измененный нами модифицированный СТАВ *протокол В* наиболее приемлемый по качеству полученной РНК и по времени необходимого для выделения. Данный метод рекомендуется для дальнейших исследовательских работ по выявлению РНК-вирусов растений методом ОТ-ПЦР.

**Благодарность:** Статья опубликована из средств проекта ПЦФ «Разработка биотехнологических подходов для контроля фитопатогенов с целью повышения продуктивности сельскохозяйственных культур» (ИРН BR21881942). Источник финансирования – Комитет науки Министерства науки и высшего образования.

### **Список источников**

1. Mumford, R., Boonham, N., Tomlinson, J., Barker, I. Advances in molecular Phytodiagnosics - new solutions for old problems. Eur. J. Plant Pathol.- 2006. – 116. P 1–19.
2. Fan Yang, Guoping Wang, Wenxing Xu, Ni Hong. A rapid silica spin column-based method of RNA extraction from fruit trees for RT-PCR detection of viruses. Journal of Virological Methods. – 2017. – 247. P 61-67
3. Gambino, G., Perrone, I., Gribaudo, I. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. Phytochem. Anal. - 2008. V – 19. P 520–525.
4. Jones, A.T., McGavin, W.J. Improved PCR detection of Black currant reversion virus in ribes and further evidence that it is the causal agent of reversion disease. Plant Dis. - 2002. V – 86. P 1333–1338.
5. 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. V – 154. P 48–55.
6. Zulaeha S., Safarrida A., Suyono A., Dwi Hartuti E., Purwoko D., Tajuddin T. A Simple and Efficient Protocol of RNA Extraction from Apple Leaves (*Malus x domestica*); A Silica Column-Based Method. International Journal of Agriculture System. – 2023. Vol. - 11. P 37-47.
7. Gehrig, H.H., Winter, K., Cushman, J., Borland, A., Taybi, T. An improved RNA isolation method for succulent plant species rich in polyphenols and polysaccharides. Plant Mol. Biol. Rep. - 2000. V – 18. P 369–376.
8. Wang, X., Tian, W., Li, Y. Development of an efficient protocol of RNA isolation from recalcitrant tree tissues. Mol. Biotechnol. - 2008. V – 38. P 57–64.
9. MacRae, E. Extraction of plant RNA. Methods Mol. Biol. - 2007. – 353. P 15–24.
10. Kansal, R., Kuhar, K., Verma, I., Gupta, R.N., Gupta, V.K., Koundal, K.R. Improved and convenient method of RNA isolation from polyphenols and polysaccharide rich plant tissues. Indian. J. Exp. Biol. - 2008. – 46. P 842–845.
11. N. Steinmetz, G. Michl, M. Maixner and C. Hoffmann A rapid and inexpensive RNA-extraction method for high-throughput virus detection in grapevine. Vitis. – 2020 V – 59. P 35–39.
12. Meisel, L., Fonseca, B., González, S., Baezayates, R., Cambiazo, V., Campos, R., Gonzalez, M., Oreliana, A., Retamales, J., Silva, H. A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for functional genomics analyses. Biol. Res. - 2005. V – 38. P 83–88.

13. Tattersall, E.A.R., Ergul, A., Alkayal, F., Deluc, L., Cushman, J.C., Cramer, G.R. Comparison of methods for isolating high-quality RNA from leaves of grapevine. *Am. J. Enol. Vitic.* - 2005. V – 56. P 400–406.
14. Portillo, M., Fenoll, C., Escobar, C. Evaluation of different RNA extraction methods for small quantities of plant tissue: combined effects of reagent type and homogenization procedure on RNA quality, integrity and yield. *Physiol. Plant.* - 2006. – 128. P 1–7.
15. Kalinowska, E., Chodorska, M., Paduch-Cichal, E., Mroczkowska, K. An improved method for RNA isolation from plants using commercial extraction kits. *Acta Biochim. Pol.* - 2012. V – 59. P 391–393.
16. Asif, M.H., Dhawan, P., Nath, P. A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. *Plant Mol. Biol. Rep.* - 2000. – 18. P 109–115.
17. Gasic, K., Hernandez, A., Korban, S.S. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Mol. Biol. Rep.* - 2004. V – 22. P 437.
18. Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA mini preparation Version II. *Plant Molecular Biology Reporter.* – 1983. Vol. 1. – P. 19-21.
19. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue *Focus* 12: – 1990. – P. 13-15.

**К.П. Аубакирова\*, Ж.Н. Бақытжанова, Л.С. Ерболова,  
А. Рахатқызы, Н.Н. Галиакпаров**

*М.А. Айтхожин атындағы молекулалық биология және биохимия институты,  
Алматы, Қазақстан, [karla\\_78@mail.ru](mailto:karla_78@mail.ru)\*, [bakytzhanovazhibek@gmail.com](mailto:bakytzhanovazhibek@gmail.com),  
[yerbolova.laura7@gmail.com](mailto:yerbolova.laura7@gmail.com), [akbotarhatkyzy1@gmail.com](mailto:akbotarhatkyzy1@gmail.com), [nurbol.gal@gmail.com](mailto:nurbol.gal@gmail.com)*

## **ЖЕМІС ЖӘНЕ ЖИДЕК ВИРУСТАРЫНЫҢ МОЛЕКУЛАЛЫҚ ДИАГНОСТИКАСЫ ҮШІН ОҢТАЙЛАНДЫРЫЛҒАН РНҚ ЭКСТРАКЦИЯ ӘДІСІ**

### ***Аңдатпа***

Жоғары эффективті РНҚ-ны тиімді оқшаулау өсімдік РНҚ вирустарын молекулалық әдістермен анықтаудың маңызды кезеңі болып табылады. Жүзім, алма және басқа жеміс өсімдіктерінің жапырақтарынан РНҚ-ны бөліп алу РНҚ-мен байланысатын немесе онымен бірге тұнбаға түсетін полисахаридтердің, полифенолдардың және басқа қосылыстардың болуына байланысты қиын. Бұл жұмыста жүзім, алма, өрік, қара өрік және жаңғақ жапырақтарынан РНҚ бөліп алу үшін цетилтриметиламмоний бромиді (СТАВ) негізіндегі нұсқаулық қолданылады. РVP және 2-меркаптоэтанол, СТАВ концентрациялары екі есе арттырылды. Әрбір жеміс дақылдары үшін 65 °С температурада СТАВ экстракция буферімен инкубация уақыты оңтайландырылды. Жүзім және алма жапырақтары үшін оңтайлы инкубация уақыты - 40 минут, өрік жапырақтары үшін - 20 минут, қара өрік пен грек жаңғақ жапырақтары үшін - 30 минут. Үш түрлі РНҚ экстракция әдістерін салыстырмалы зерттеу нәтижесінде оңтайландырылған нұсқаулық негізінде алынған РНҚ-ның ең жоғары сапасы мен санын қамтамасыз ететінін көрсетті, электрофорез және спектрофотометриялық талдау арқылы расталды. Біздің ұсынып отырған нұсқаулықпен бөлініп алынған РНҚ, кДНҚ және ПТР синтезі сияқты кейінгі молекулалық талдауларға жарамды, бұл оның жүзім, алма, өрік, қара өрік және жаңғақ сияқты жеміс ағаштарының әртүрлі түрлеріндегі вирустарды анықтауға жарамдылығын көрсетеді. ПТР көмегімен өсімдік РНҚ вирустарын анықтау бойынша қосымша зерттеулерде қолдану үшін өзгертілген әдіс ұсынылады.

***Кілт сөздер:*** жүзім, алма ағашы, өрік, қара өрік, грек жаңғағы, РНҚ бөліп алу, жеміс өсімдіктерінің вирустары, СТАВ.

*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\*<sup>1,2</sup>, Г.Э. Станбекова<sup>1</sup>, Б.К. Искаков<sup>1</sup>, А.В. Жигайлов<sup>1</sup>*

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

<sup>2</sup> *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