

DETERMINATION OF THE VIRAL DISEASES COMPOSITION OF STONE FRUIT CLONAL ROOTSTOCKS IN KAZAKHSTAN AND IN VITRO REPRODUCTION FEATURES OF HEALTHY PLANTS

Abstract

One of the important tasks of nursery farming in Kazakhstan is the need to produce not only standard, but also virus-free certified planting material. The first step in this direction with the aim of re-equipping horticulture in the republic is the planting of basic mother plantations with virus-free planting material. The solution of these issues became possible with the development and implementation of biotechnological systems in nursery farming. The article presents the composition of viral diseases of stone fruit clonal rootstocks in Kazakhstan and the results of improving the protocol of their clonal micropropagation at various stages. A collection of clonal rootstocks for plum, apricot and peach, consisting of 9 genotypes, was tested for the presence of 7 viruses. According to the result of PCR analysis, clonal rootstocks are free of viral diseases, and the Plum pox potyvirus (PPV) virus was detected in form No. 3 of the wild apricot *P. armeniaca*.

Virus-free plants were introduced into aseptic culture *in vitro*. The experiments showed that the shoots of stone fruits rootstocks are effectively sterilized from saprophytic microflora with 0.2% HgCl₂ for 3 and 4 minutes. In this case, the number of those capable of regeneration is 70% and 80%. The best medium for introducing explants is MS nutrient medium - 0.2-0.4 mg / l BAP, 2.0 mg / l ascorbic acid, 0.5 mg / l B₁, 0.5 mg / l B₆, 0.5 mg / l PP and 30 mg / l sucrose. The optimal medium for clonal propagation *in vitro* is MS with a vitamin content of 0.1 mg / l B₁, 0.5 mg / l B₆, 0.5 mg / l PP, 1 mg / l C, 100 mg / l mesoinositol, 2 mg / l glycine, 0.8 mg / l 6-BAP. The explants cultivated on this medium showed good development of conglomerates, shoot height within 1.5-2.0 cm. Virus-free 7 clonal rootstocks were introduced and propagated *in vitro*.

Key words: clonal rootstocks, stone fruits, viruses, biotechnology, *in vitro* propagation, nutrient medium, virus-free material.

МРНТИ 34.15.31

DOI <https://doi.org/10.37884/3-2024/11>

А.К. Маденова¹, Д. И. Калдыбаева*¹, Р.А. Әбдікәрімова¹, А.А. Қуан^{1,2}

¹ *Казахский Национальный аграрный исследовательский университет,
г. Алматы, Казахстан, aigul.kalikhodzhaevna@kaznaru.edu.kz,
dinara.kaldybayeva@kaznaru.edu.kz*, Raigul-95@mail.ru*

² *Казахский Национальный университет им. Аль Фараби, г. Алматы, Казахстан,
kuan.angsagan2001@gmail.com*

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЯБЛОНИ В КАЗАХСТАНСКИХ САДАХ МЕТОДОМ ОТ-ПЦР-РВ

Аннотация

В Казахстане яблоки занимают доминирующее место в агроэкономической нише страны, что доказывает огромные площади посевов этих культур. Однако уровень вирусной инфекции яблок, как правило, высок, поскольку широко используются подвои, полученные из зараженных вирусом материнских подвоев, а вегетативное размножение, основанное на прививке, широко распространено среди подвойных сортов. Наиболее эффективный способ борьбы с вирусами и вириоидами растений зависит от проведения массово быстрого и точного диагностического обследования. Поэтому целью данного исследования было изучение распространения двух вирусов ACLSV, ASPV и вириода AHVd в трех областях Казахстана. Обнаружение вирусов основано на использовании сочетания методов обратной транскрипции

и мультиплексной полимеразной цепной реакции с получением результата в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ). Среди 49 образцов, собранных из коммерческих садов южного и юго-восточного Казахстана, ОТ-ПЦР в реальном времени выявил положительные результаты 18,4% ACLSV, 10,2% ANVd, а так же 51,02% ASPV. Полученные результаты могут использоваться для оздоровления и получения безвирусного маточного материала. Таким образом решается проблема обеспечения рынка Казахстана качественным отечественным посадочным материалом яблони.

Ключевые слова: яблоня, подвои, сорт, вирусные заболевания, вириод, ACLSV, ASPV, ANVd, РНК, ОТ-ПЦР-РВ.

Введение

Яблоня (*Malus domestica* L.) уже давно является наиболее экономически важной плодовой культурой во многих частях мира и, в частности, Казахстана. По данным сельского хозяйства, казахстанцы ежегодно потребляют 344,3 тыс. тонн яблок, из которых 144 тыс. тонн импортируется. Основными плодоносящими районами Казахстана являются южные регионы — Южно-Казахстанская — 18 024,6 га, Алматинская — 16 180,7 га и Жамбылская — 5 794,7 га. Природно-климатические условия этих регионов подходят для выращивания высококачественных фруктов, способных конкурировать с зарубежной продукцией [1].

В Казахстане до сих пор применяют традиционные методы размножения и выращивания посадочного материала плодовых культур. К сожалению, эти саженцы не отвечают всем требованиям современного садоводства, которое стремится к интенсификации. В связи с отсутствием в республике производства безвирусного посадочного материала семечковых культур, является сочетание традиционных способов питомниководства и биотехнологических методов оздоровления, размножения и получения безвирусных растений яблони и груши с учетом видового состава вирусных болезней, сортовой специфичности районированных сортов на территории Казахстана. Например, о распространении на юго-западе Китая нового иларвируса на яблоне (ArNMV) сообщили Shi W и др. [2]. Симптомы нового вируса ArNMV очень похожи с apple mosaic virus (ArMV), который уже распространен по всему миру. Риск распространения новых вирусов на территории Казахстана велик и является достаточно быстрым, учитывая обмен посадочным материалом и плодовой продукцией между странами. Как известно, яблоня поражается несколькими патогенами [3; 4]. В настоящее время существует более 340 типов вирусов или вирусоподобных заболеваний, которые встречаются в семечковых культурах, а яблони заражены по меньшей мере 12 вирусами или вирусоподобными болезнями, что приводит к серьезным экономическим потерям [5]. Хотя известно множество видов вирусов и вириодов, заражающих яблоню, только пять агентов (вирус хлоротической пятнистости листьев яблони - ACLSV, вирус мозаики яблони - ArMV, вирус бороздчатость стебля яблони - ASGV, вирус ямчатости стебля яблони - ASPV и вириод рубцовой кожицы яблони) тестируются при размножении яблони [6].

Вирус хлоротической пятнистости листьев яблони (ACLSV) является одним из самых важных системных инфекций яблонь в Европе и в Казахстане. ACLSV является широко распространенным латентным вирусом яблок с уровнем инфицирования, превышающим 90% [7].

Вирус ямчатости стебля яблони (ASPV) — вид рода Foveavirus семейства Betaflexiviridae [8]. Встречается во всем мире и относится к серьезным вирусам, поражающим яблоню [7]. Инфекция обычно латентна во многих сортах и остается незамеченной, несмотря на ее высокую частоту. Часто в сочетании с другими латентными болезнями яблонь (ACLSV, ASGV и т. д.) это поражение является основной причиной снижения качества и количества урожая.

Как и вирусы, вириоды также повреждают яблони, в том числе вириод молотоголовой палочки (ANVd) был первоначально обнаружен с помощью алгоритма вычислений прогнозирования с данными HTS малых РНК яблок [9]. Позднее прогноз был подтвержден с помощью ОТ-ПЦР. Первоначальные исследования не сообщали о каких-либо специфических симптомах у деревьев, положительных по ANVd [9; 10] Дальнейшие открытия ANVd у

симптоматических деревьев показали наличие распространенных вирусов ябллок [11; 12], что делает любую корреляцию между заражением вириодом и наблюдаемыми симптомами невозможной. Впоследствии ANVd был зарегистрирован во всем мире на яблонях в Африке [13], Северной Америке [12], Японии, Новой Зеландии и Европе [12; 14; 15], а также на других семечковых культурах [15].

Деревья, зараженные вирусами и вирусоподобными патогенами, нельзя дезинфицировать после посадки на постоянное место. Инфекция часто носит системный характер, и экономический ущерб сохраняется в различной степени на протяжении всей жизни отдельного дерева в производственном саду [7].

Вирусы и вириоды, вызывающие такое разнообразие повреждений и уже встречались во многих яблоневых садах, но большинство фермеров, выращивающих яблоки, не знают точной скорости заражения и степени ущерба. Поэтому для решения этой проблемы была исследована инфекционность двух вирусов и вириода среди яблоневых садов, возделываемых в основных производственных районах Казахстана. Целью данного исследования было выявление распространенности основных вирусных болезней яблоневых культур в коммерческих садах Казахстана.

Материалы и методы исследование

Исследование началось в июне 2024 года. Материалом для исследования служили 49 образцов яблони, отобранные из садов Алматинской, Туркестанской и Жамбылской областей (Таблица 1).

Таблица 1. Наименование отобранных сортов яблони из трех областей с координатами.

Сельский округ К/Х	Наименование сортов	Координаты
Талгарский район, Региональный Филиал «Талгар» сады ТОО «КазНИИ плодовоовощеводства»	Прима S	N 43°17'27"
	Эль Роса	E 77°12'15"
	Голден Делишес	
	Синап Алматинский	
	Айдаред	
	Ред Эль Стар	
	Золотая Крона	
	Московская	
	Пилот	
	Егемен	
	Рахат	
	Кавказ	
	Вильстон Стар	
	Самурет	
	Тюльпан	
	Талгарская	
	Пеструшка	
	Мария ред	
	Джоана голд	
	Салтанат	
Пинова		
Эль Графт Эль Стар		
Бребурн		
Ветерок		
Бель Флер Алматинка		
Фуджи		
Ренат Ландс		
Туркестанская область, Тюлькубаский район, К/Х «Коктал»	Айдаред	N42°33'32.288"
	Апорт	E70°24'2.687"

	Розмарин	
	Мелба	
	Старкримпсон	
	Тюльпан	
	Гала	
	Кандия Синап	
	Золотой Превосход	
Туркестанская область, Казыгуртский район	Пинк Леди	N41°36'7.637" E69°22'2.022"
	Апорт	
	Айдаред	
	Старкримпсон	
Сарыагашский район, село Жемисти Региональный филиал «Сарыагаш» ТОО «КазНИИ плодоовощеводства»	Белый Налив	N 41°32'2.545" E 69°21'36.069"
	Весна	
	Боровинка Ташкентская	
	Мелба	
	Конфетка	
	Старкримпсон	
Жамбылская область, Меркенский район, село Мерке	Гузель	N42°48'.584" E73°10'.387"
	Конфетка	
	Ред Делишес	

Выделение РНК проводилось реагентами Российской компании ООО «Синтол». Набор реагентов «ФитоСорб» предназначен для выделения нуклеиновых кислот (НК) из растительного материала. Набор также может использоваться для выделения НК фитопатогенов из растительного материала - вирусов, вириодов, бактерий и др. Для выделения использовались свежие зеленые листья собранные во время отбора образцов.

Выявление вирусов проведено использованием набора реагентов «Real-Time PCR Detection Kit» («LETGEN BIYOTEKNOLOJİ LABORATUVAR LTD.STİ», Izmir, Turkiye www.letgenbio.com).

Обнаружения специфичных фрагментов РНК вирусов основано на использовании сочетания методов обратной транскрипции и мультиплексной полимеразной цепной реакции с получением результата в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ).

Набор от «Real-Time PCR Detection Kit» содержит праймеры двух вирусов ACLSV и ASPV, и вириода ANVd, а его зонд основан на TaqMan технологии. В особенности, праймеры и зонд представляют собой 100% гомологию с более чем 95% эталонных последовательностей из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), доступных на момент разработки.

Компоненты ОТ-ПЦР-РВ представляет собой, общий объём смеси 20 мкл, и каждый из них состоит РНК 4 мкл, qPCR MasterMix 10 мкл, Primer-Probe Mix 2 мкл, RTase Mix 1 мкл, деионизированная вода 2 мкл. Протокол амплификации в реальном времени для всех вирусов и вириода был следующим образом: 15 минут при 50°C для обратной транскрипции, 2 минут при 95°C для активации полимеразы, 40 циклов 10 секунд при 95°C, 30 секунд 60°C.

Результаты и обсуждения

По данному анализу ПЦР-РВ предоставлен график заболевания яблони. Амплификация проводилась в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов для обнаружения РНК возбудителя ASPV, ACLSV и ANVd методом ОТ-ПЦР-РВ.

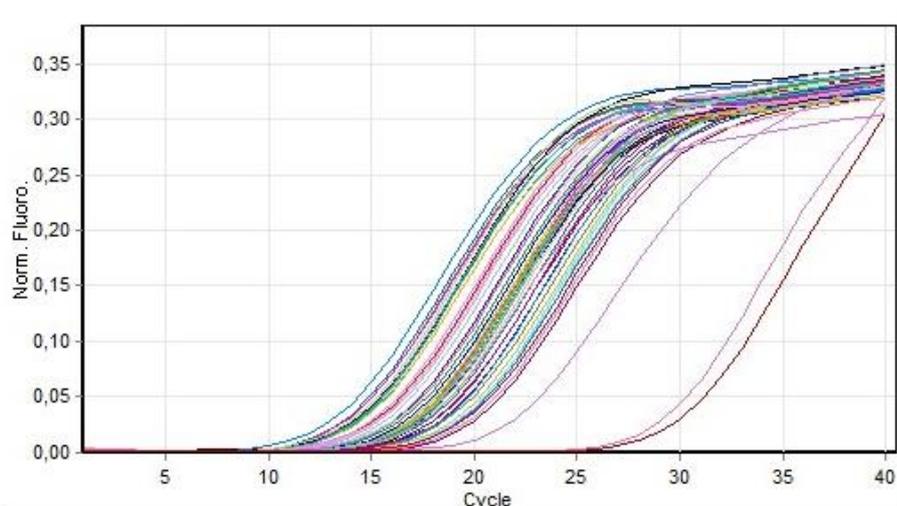


Рисунок 1. Количественные данные для Cycling A.Yellow / HEX по результатам ОТ-ПЦР-РВ анализа ASPV, ACLSV и ANVd.

Для определения внутреннего контроля ОТ-ПЦР-РВ анализа используются данные графика Yellow / HEX (Рисунок 1). В графике Cycling A.Yellow / HEX видно прохождение реакции по HEX /Yellow $Ct \leq 35$, что говорит о достаточном качестве забора материала, эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР. При отсутствии реакции по каналу HEX/Yellow, или $Ct > 35$, и одновременном отсутствии реакции по каналам спецификации FAM/Green, то результат следует считать не валидным. Что обязует для данного исследуемого образца провести повторное исследование, начиная с выделения НК.

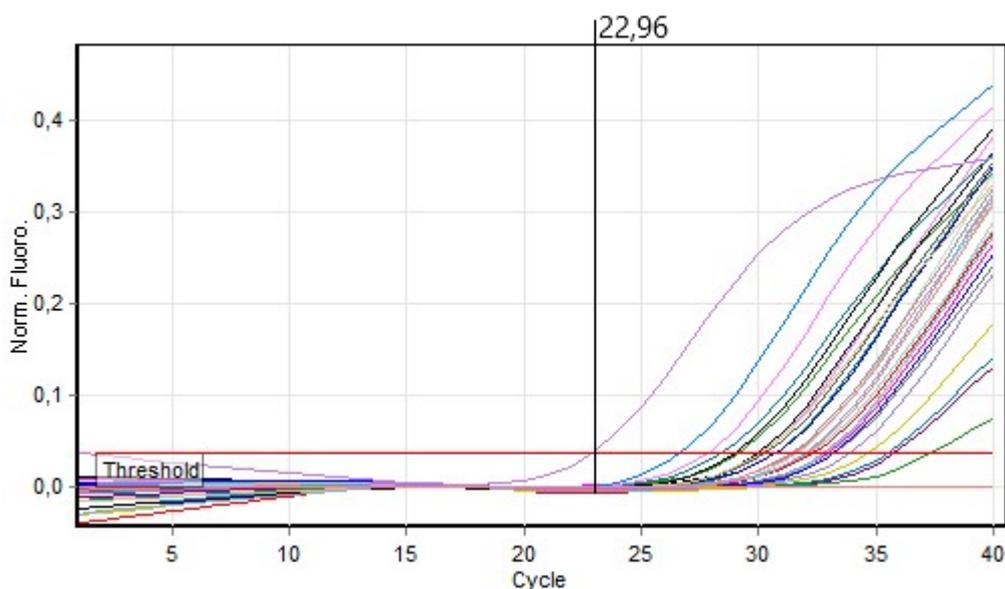


Рисунок 2. Количественные данные для Cycling A.Green / FAM ASPV00.

В рисунке 2 представлен график Cycling A. Green / FAM ASPV00, где хорошо выражена экспоненциальная фаза во всех положительных образцах. На 22 цикле находится линия положительного контроля. До 20 цикла флуоресценция слабая, так как продукта мало, поэтому ее трудно отличить от фона. По мере накопления продукта, уже выше 20 цикла сигнал растет экспоненциально, а затем после 30-35 цикла некоторые образцы выходят на плато. Из 49 образцов почти 50% заражены вирусом ямчатости стебля яблони ASPV.

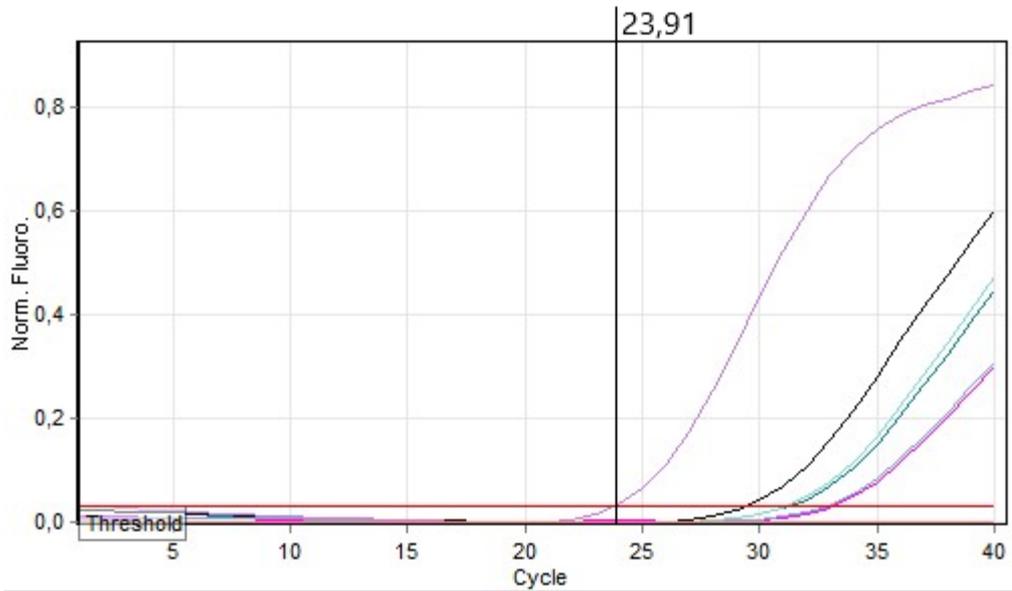


Рисунок 3. Количественные данные для Cycling A.Green / FAM AHVd00.

В результатах графика (Рисунок 3) Cycling A. Green / FAM AHVD00 так же хорошо выражена экспоненциальная фаза у положительного контроля, которая начинается с 23 цикла. Из 49 образцов выявлен данный вириод AHVD из 5 образцов, FAM Ct \leq 35 циклов которая указывает на достоверность результатов.

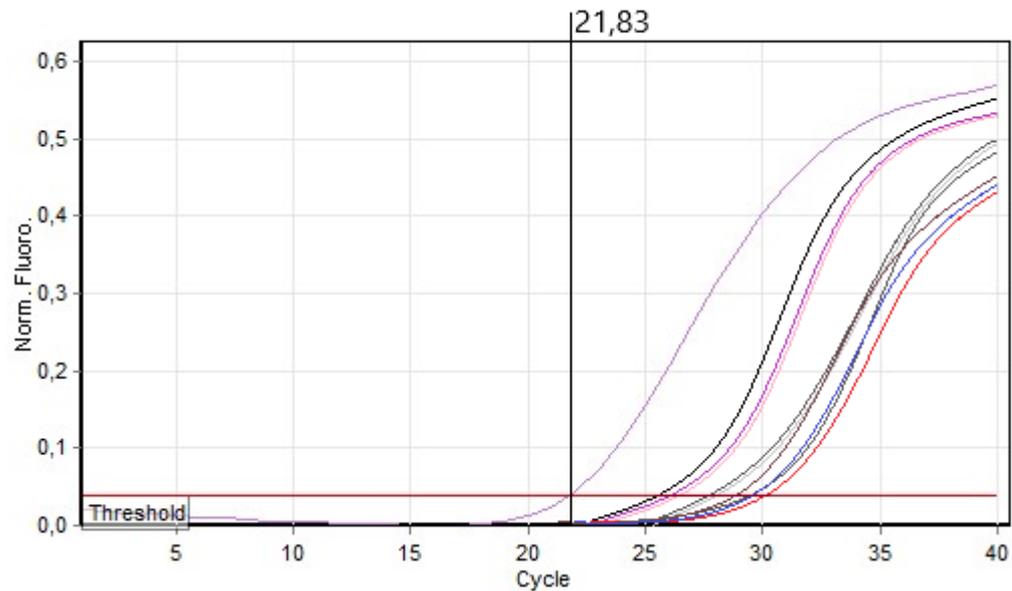


Рисунок 4. Количественные данные для Cycling A.Green / FAM ACLSV.

И наконец, при анализе на вирус ACLSV 9 образцов показали идентифицируемые результаты, демонстрируя четко наблюдаемую экспоненциальную фазу во всех образцах (Рисунок 4). Флуоресценция изначально слабая, из-за минимального присутствия продукта, что затрудняет обнаружение. По мере накопления продукта сигнал экспоненциально растет после 20 цикла, выравниваясь между 30 и 35 циклами. Положительный контроль начинает расти с 21-го цикла. Наименования всех образцов приведены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты ОТ-ПЦР-РВ 49 образцов на вирусы ASPV, AHVd, ACLSV.

Цвет	Наименование сортов	Тип образца	Ct Green ASPV	Ct Green AHVd	Ct Green ACLSV
	Талгар Прима S	Unknown	NEG	NEG	NEG
	Талгар Эль Роса	Unknown	NEG	NEG	NEG
	Талгар Голден Делишес	Unknown	NEG	NEG	NEG
	Талгар Синап Алматинский	Unknown	NEG	NEG	NEG
	Талгар Айдаред	Unknown	30,18	NEG	26,97
	Талгар Ред Эль Стар	Unknown	NEG	NEG	NEG
	Талгар Золотая Крона	Unknown	30,75	31,38	NEG
	Талгар Московская	Unknown	32,10	NEG	NEG
	Талгар Пилот	Unknown	29,18	NEG	NEG
	Талгар Егемен	Unknown	33,02	33,21	NEG
	Талгар Рахат	Unknown	30,00	29,50	26,08
	Талгар Кавказ	Unknown	NEG	NEG	NEG
	Талгар Вильстон Стар	Unknown	NEG	NEG	NEG
	Талгар Самурет	Unknown	NEG	NEG	NEG
	Талгар Тюльпан	Unknown	31,55	31,21	NEG
	Талгар Талгарская	Unknown	32,84	32,97	NEG
	Талгар Пеструшка	Unknown	NEG	NEG	NEG
	Талгар Мария ред	Unknown	NEG	NEG	NEG
	Талгар Джоана голд	Unknown	NEG	NEG	27,14
	Талгар Салтанат	Unknown	NEG	NEG	NEG
	Талгар Пинова	Unknown	NEG	NEG	NEG
	Талгар Эль Графт Эль Стар	Unknown	NEG	NEG	NEG
	Талгар Бребурн	Unknown	NEG	NEG	NEG
	Талгар Ветерок	Unknown	NEG	NEG	NEG
	Талгар Бель Флер Алматинка	Unknown	30,80	NEG	NEG
	Талгар Фуджи	Unknown	NEG	NEG	NEG
	Талгар Ренат Ландс	Unknown	NEG	NEG	NEG
	Тюлькубас Айдаред	Unknown	31,71	NEG	27,24
	Тюлькубас Апорт	Unknown	32,95	NEG	27,58
	Тюлькубас Розмарин	Unknown	31,41	NEG	28,02
	Тюлькубас Мелба	Unknown	33,25	NEG	NEG
	Тюлькубас Старкримпсон	Unknown	30,32	NEG	29,73
	Тюлькубас Тюльпан	Unknown	32,37	NEG	30,11
	Тюлькубас Гала	Unknown	NEG	NEG	NEG
	Тюлькубас Кандия Синап	Unknown	33,22	NEG	29,87
	Тюлькубас Золотой Превосход	Unknown	NEG	NEG	NEG
	Казыгурт Пинк Леди	Unknown	27,87	NEG	NEG
	Казыгурт Апорт	Unknown	26,71	NEG	NEG
	Казыгурт Айдаред	Unknown	28,48	NEG	NEG
	Казыгурт Старкримпсон	Unknown	31,54	NEG	NEG
	Жемисти Белый Налив	Unknown	NEG	NEG	NEG
	Жемисти Весна	Unknown	NEG	NEG	NEG
	Жемисти Боровинка Ташкентская	Unknown	29,03	NEG	NEG

	Жемисти Мелба	Unknown	NEG	NEG	NEG
	Жемисти Конфетка	Unknown	30,12	NEG	NEG
	Жемисти Старкримпсон	Unknown	NEG	NEG	NEG
	Мерке Гузель	Unknown	32,20	NEG	NEG
	Мерке Конфетка	Unknown	31,98	NEG	NEG
	Мерке Ред Делишес	Unknown	33,96	NEG	NEG
	+ Позитивный контроль	Positive Control	22,96	23,91	
	- Негативный контроль	Negative Control	NEG	NEG	NEG

Тест ПЦР в реальном времени проведен с использованием 49 образцов, собранных из коммерческих садов расположенные в южном и юго-восточном Казахстане для обнаружения вирусных заболеваний с помощью красителя SYBR Green / FAM. Анализ сопоставлен с однопрослойным и мультиплексным RT-PCR для обнаружения трех вирусов ASPV, ANVd, ACLSV. Среди 49 образцов, ПЦР в реальном времени выявил 18,4% (9/49) положительных для ACLSV, в то время как 10,2% (5/49) образцов были обнаружены положительными для вириода ANVd, а так же, 51,02% (25/49) положительных для ASPV. Примечательно, что в других исследованиях отмечается, что проведение ПЦР анализа классическим методом не дает возможность выявления вируса ACLSV [16].

Также в других работах казахстанских ученых [17] проверены посадочные материалы, импортированные из Турции и Италии. По полученным результатам наиболее распространенным вирусом в образцах является ACLSV (60 %), за ним следуют ASPV с 34 %, ASGV с 30 % и ApMV с 2 %. Анализ образцов показал, что 60 % посадочных материалов были заражены по крайней мере одним вирусом, некоторые образцы были заражены одновременно тремя видами. Кроме того, наши результаты ОТ-ПЦР-РВ анализа подтверждают данные с этого исследования. Также паралельно с этим в прошлом году нами проводился мониторинг на распространению грибковых заболеваний, в частности парши, и обнаружение устойчивых сортов в садах Туркестанского, Жамбылского и Алматинского областей [18].

Таким образом, проведен молекулярный скрининг по распространению вирусных заболеваний в коммерческих садах трех областях Казахстана.

Выводы

По проведенным исследованиям можно заметить, что в садах южно и юго-Восточного Казахстана большое количество заражений в среди собранных образцов 51% поражении занимает вирус ASPV. Полученные разработки могут служить для дальнейших работ для оздоровление безвирусного маточного материала. Данные являются ценными и решить проблему обеспечения рынка Казахстана качественным отечественным посадочным материалом яблони.

Благодарность: Данная статья выполнена при поддержке в Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан в рамках проекта AP19676378 «Разработка методов получения элитного посадочного материала семечковых культур на основе изучения вирусных болезней с применением методов биотехнологии».

Список литературы

1 Galymbek K., A. K. Madenova, S. B. Bakirov, B. Zh Kabylbekova, A. Irkitbay, Zh Aitymbet, D. I. Kaldybayeva, R. Abdikarimova, and Bolat Munira. Monitoring the distribution and development of apple scab (*Venturia inaequalis*) and powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*) disease in the southern and southeast regions of Kazakhstan //Bulletin of the Karaganda university Biology. Medicine. Geography series. – 2023. – Т. 110. – №. 2. – С. 38-45.

2 Shi W., Yao R., Sunwu R., Huang K., Liu Z., Li X., Yang Y., Wang J. Incidence and molecular identification of apple necrotic mosaic virus (ApNMV) in Southwest China //Plants. – 2020. – Т. 9. – №. 4. – С. 415.

- 3 EFSA Panel on Plant Health (EFSA PLH Panel), Bragard C., Dehnen-Schmutz K., Gonthier P., Jacques M., Jaques Miret J.A., Justesen A.F., MacLeod A., Magnusson C.S., Milonas P., et al. Pest categorisation of the *Ralstonia solanacearum* species complex //EFSA Journal. – 2019. – Т. 17. – №. 2. – С. e05618.
- 4 Wright A. A., Cross A. R., Harper S. J. A bushel of viruses: Identification of seventeen novel putative viruses by RNA-seq in six apple trees //PLoS One. – 2020. – Т. 15. – №. 1. – С. e0227669.
- 5 Saade M., Aparicio, F., Sanchez-Navarro, J. A., Herranz, M. C., Myrta, A., Di Terlizzi, B., Pallas, V. Simultaneous detection of the three ilarviruses affecting stone fruit trees by nonisotopic molecular hybridization and multiplex reverse-transcription polymerase chain reaction //Phytopathology. – 2000. – Т. 90. – №. 12. – С. 1330-1336.
- 6 Várallyay E., Příbylová J., Galbacs Z.N., Jahan A., Varga T., Špak J., Lenz O., Fránová J., Sedlák J., Koloniuk I. Detection of Apple hammerhead viroid, Apple Luteovirus 1 and Citrus Concave gum-associated virus in apple propagation materials and orchards in the Czech Republic and Hungary //Viruses. – 2022. – Т. 14. – №. 11. – С. 2347.
- 7 Hassan M., Polak J., Paprštein F. Detection and distribution of four pome fruit viruses in germplasm collection in the Czech Republic //XX International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops-Fruit Tree Diseases 781. – 2006. – С. 113-118.
- 8 Yoshikawa N., Yaegashi H. Betaflexiviruses (Betaflexiviridae) //Encyclopedia of Virology. – 2021. – С. 229-238.
- 9 Zhang Z., Qi S., Tang N., Zhang X., Chen S., Zhu P., Wu Q. Discovery of replicating circular RNAs by RNA-seq and computational algorithms //PLoS pathogens. – 2014. – Т. 10. – №. 12. – С. E1004553.
- 10 Serra P., Messmer A., Sanderson D., James D., Flores R. Apple hammerhead viroid-like RNA is a bona fide viroid: Autonomous replication and structural features support its inclusion as a new member in the genus Pelamoviroid //Virus research. – 2018. – Т. 249. – С. 8-15.
- 11 Messmer A., Sanderson D., Braun G., Serra P., Flores R., James D. Molecular and phylogenetic identification of unique isolates of hammerhead viroid-like RNA from ‘Pacific Gala’ apple (*Malus domestica*) in Canada //Canadian Journal of Plant Pathology. – 2017. – Т. 39. – №. 3. – С. 342-353.
- 12 Szostek S. A., Wright A. A., Harper S. J. First report of apple hammerhead viroid in the United States, Japan, Italy, Spain, and New Zealand //Plant Disease. – 2018. – Т. 102. – №. 12. – С. 2670-2670.
- 13 Hamdi I., Soltani R., Baraket G., Varsani A., Najar A. First report of apple hammerhead viroid infecting ‘Richared Delicious’ apple (*Malus domestica*) in Tunisia //Journal of Plant Pathology. – 2022. – Т. 104. – №. 2. – С. 811-812.
- 14 Chiumenti M., Navarro B., Venerito P., Civita F., Minafra A., Di Serio F. Molecular variability of apple hammerhead viroid from Italian apple varieties supports the relevance in vivo of its branched conformation stabilized by a kissing loop interaction //Virus research. – 2019. – Т. 270. – С. 197644.
- 15 Pareta N. F., Lateur M., Steyer S., Blouin A. G., Massart S. First reports of Apple luteovirus 1, Apple rubodvirus 1 and Apple hammerhead viroid infecting apples in Belgium //New Disease Reports. – 2022. – Т. 45. – №. 2.
- 16 Heo S., Chung Y. S. Rapid real-time detection method of ACLSV and ASSVd for apple quarantine field //Plant Biotechnology Reports. – 2021. – Т. 15. – С. 187-195.
- 17 Gritsenko D. A., Aubakirova K. P., Voitsekhovskiy I., Soldatova I., Galiakparov N. N. Simultaneous detection of five apple viruses by RT-PCR //International Journal of Biology and Chemistry. – 2020. – Т. 13. – №. 1. – С. 129-134.
- 18 Madenova A., Aitymbet Z., Bolat M., Kaldybayeva D., Galymbek K., Kuan A., Kabyzbekova B., Irkitbay A., Yeszhanov T., Bakirov S., Sapakhova Z. Screening of Apple Cultivars for Scab Resistance in Kazakhstan //Horticulturae. – 2024. – Т. 10. – №. 2. – С. 184.

References

- 1 Galymbek K., A. K. Madenova, S. B. Bakirov, B. Zh Kabylbekova, A. Irkitbay, Zh Aitymbet, D. I. Kaldybayeva, R. Abdikarimova, and Bolat Munira. Monitoring the distribution and development of apple scab (*Venturia inaequalis*) and powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*) disease in the southern and southeast regions of Kazakhstan //Bulletin of the Karaganda university Biology. Medicine. Geography series. – 2023. – T. 110. – №. 2. – S. 38-45.
- 2 Shi W., Yao R., Sunwu R., Huang K., Liu Z., Li X., Yang Y., Wang J. Incidence and molecular identification of apple necrotic mosaic virus (ApNMV) in Southwest China //Plants. – 2020. – T. 9. – №. 4. – S. 415.
- 3 EFSA Panel on Plant Health (EFSA PLH Panel), Bragard C., Dehnen-Schmutz K., Gonthier P., Jacques M., Jaques Miret J.A., Justesen A.F., MacLeod A., Magnusson C.S., Milonas P., et al. Pest categorisation of the *Ralstonia solanacearum* species complex //EFSA Journal. – 2019. – T. 17. – №. 2. – S. e05618.
- 4 Wright A. A., Cross A. R., Harper S. J. A bushel of viruses: Identification of seventeen novel putative viruses by RNA-seq in six apple trees //PLoS One. – 2020. – T. 15. – №. 1. – S. e0227669.
- 5 Saade M., Aparicio, F., Sanchez-Navarro, J. A., Herranz, M. C., Myrta, A., Di Terlizzi, B., Pallas, V. Simultaneous detection of the three ilarviruses affecting stone fruit trees by nonisotopic molecular hybridization and multiplex reverse-transcription polymerase chain reaction //Phytopathology. – 2000. – T. 90. – №. 12. – S. 1330-1336.
- 6 Várallyay E., Příbylová J., Galbacs Z.N., Jahan A., Varga T., Špak J., Lenz O., Fránová J., Sedlák J., Koloniuk I. Detection of Apple hammerhead viroid, Apple Luteovirus 1 and Citrus Concave gum-associated virus in apple propagation materials and orchards in the Czech Republic and Hungary //Viruses. – 2022. – T. 14. – №. 11. – S. 2347.
- 7 Hassan M., Polak J., Paprštejn F. Detection and distribution of four pome fruit viruses in germplasm collection in the Czech Republic //XX International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops-Fruit Tree Diseases 781. – 2006. – S. 113-118.
- 8 Yoshikawa N., Yaegashi H. Betaflexiviruses (Betaflexiviridae) //Encyclopedia of Virology. – 2021. – S. 229-238.
- 9 Zhang Z., Qi S., Tang N., Zhang X., Chen S., Zhu P., Wu Q. Discovery of replicating circular RNAs by RNA-seq and computational algorithms //PLoS pathogens. – 2014. – T. 10. – №. 12. – S. E1004553.
- 10 Serra P., Messmer A., Sanderson D., James D., Flores R. Apple hammerhead viroid-like RNA is a bona fide viroid: Autonomous replication and structural features support its inclusion as a new member in the genus Pelamoviroid //Virus research. – 2018. – T. 249. – S. 8-15.
- 11 Messmer A., Sanderson D., Braun G., Serra P., Flores R., James D. Molecular and phylogenetic identification of unique isolates of hammerhead viroid-like RNA from ‘Pacific Gala’ apple (*Malus domestica*) in Canada //Canadian Journal of Plant Pathology. – 2017. – T. 39. – №. 3. – S. 342-353.
- 12 Szostek S. A., Wright A. A., Harper S. J. First report of apple hammerhead viroid in the United States, Japan, Italy, Spain, and New Zealand //Plant Disease. – 2018. – T. 102. – №. 12. – S. 2670-2670.
- 13 Hamdi I., Soltani R., Baraket G., Varsani A., Najar A. First report of apple hammerhead viroid infecting ‘Richared Delicious’ apple (*Malus domestica*) in Tunisia //Journal of Plant Pathology. – 2022. – T. 104. – №. 2. – S. 811-812.
- 14 Chiumenti M., Navarro B., Venerito P., Civita F., Minafra A., Di Serio F. Molecular variability of apple hammerhead viroid from Italian apple varieties supports the relevance in vivo of its branched conformation stabilized by a kissing loop interaction //Virus research. – 2019. – T. 270. – S. 197644.
- 15 Pareta N. F., Lateur M., Steyer S., Blouin A. G., Massart S. First reports of Apple luteovirus 1, Apple rubodvirus 1 and Apple hammerhead viroid infecting apples in Belgium //New Disease Reports. – 2022. – T. 45. – №2.

16 Heo S., Chung Y. S. Rapid real-time detection method of ACLSV and ASSVd for apple quarantine field //Plant Biotechnology Reports. – 2021. – Т. 15. – С. 187-195.

17 Gritsenko D. A., Aubakirova K. P., Voitsekhovskiy I., Soldatova I., Galiakparov N. N. Simultaneous detection of five apple viruses by RT-PCR //International Journal of Biology and Chemistry. – 2020. – Т. 13. – №. 1. – С. 129-134.

18 Madenova A., Aitymbet Z., Bolat M., Kaldybayeva D., Galymbek K., Kuan A., Kabyzbekova B., Irkitbay A., Yeszhanov T., Bakirov S., Sapakhova Z. Screening of Apple Cultivars for Scab Resistance in Kazakhstan //Horticulturae. – 2024. – Т. 10. – №. 2. – С. 184.

*A.K. Madenova¹, D.I. Kaldybayeva*¹, R. A. Abdikarimova¹, A.A. Kuan^{1,2}*

*¹ Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, Kazakhstan,
aigul.kalikhzhayeva@kaznaru.edu.kz, dinara.kaldybayeva@kaznaru.edu.kz*, Raigul-95@mail.ru*

*² Al Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan,
kuan.angsagan2001@gmail.com*

IDENTIFICATION OF APPLE VIRAL DISEASES IN KAZAKHSTAN ORCHARDS BY RT-PCR METHOD

Abstract

In Kazakhstan, apples dominate the country's agro-economic niche, as evidenced by the huge gardens of crops. However, the widespread usage of rootstocks derived from virus-infected maternal and vegetative reproduction causes apples to have high levels of viral infection, which is widely used as a grafting among varieties. To fight viruses and viroids in plants, a mass, rapid, and accurate diagnostic examination is the most effective method. Therefore, this study aimed to investigate the spread of two viruses ACLSV, ASPV and viroid AHVd in three regions of Kazakhstan. Virus detection is based on a combination of reverse transcription methods and a multiplexed polymerase chain reaction with real-time results (RT-PCR). Among 49 samples, RT-PCR in real time showed positive results of 18.4% ACLSV, 10.2% AHVd, and 51.02% ASPV. The results can be used for healing and to obtain virus-free stock material. Thus, the problem of providing the market of Kazakhstan with quality domestic planting material for trees has been solved.

Key words: apple, rootstocks, variety, viral diseases, viroid, ACLSV, ASPV, AHVd, RNA, RT-PCR.

*A.K. Маденова¹, Д.И. Калдыбаева*¹, Р. А. Әбдікәрімова¹, А.А. Қуан^{1,2}*

*¹ Қазақ Ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Алматы қ., Қазақстан,
aigul.kalikhzhayeva@kaznaru.edu.kz, dinara.kaldybayeva@kaznaru.edu.kz*, Raigul-95@mail.ru*

*² Әл - Фараби атындағы Қазақ Ұлттық университеті, Алматы қ., Қазақстан,
kuan.angsagan2001@gmail.com*

ҚАЗАҚСТАНДЫҚ БАҚШАЛАРЫНДА АЛМА АҒАШЫНЫҢ ВИРУСТЫҚ АУРУЛАРЫН КТ-НУ-ПТР ӘДІСІМЕН АЙҚЫНДАУ

Аңдатпа

Қазақстанның агроэкономика саласында алма орасан зор орын алады. Бұл алма бақтарының көптігімен дәлелденеді. Дегенмен, алманың вирус жұқтыру жылдамдығы өте жоғары. Себебі өндірістік бақтарда вирус жұқтырған аналық телушілерден алынған телу сабақтары кеңінен қолданылады. Вирустар егуге негізделген вегетативті көбею телуші сорттар арасында кең таралған. Өсімдіктерде кездесетін вирус және виroidтармен күресудің ең тиімді және кең тараған жолы, жылдам және дәл диагностикалық тестілеуге байланысты болады. Сондықтан бұл зерттеудің мақсаты Қазақстанның үш аймағында ACLSV, ASPV вирусының және AHVd виroidының таралуын зерттеу болды. Вирустарды анықтау кері транскрипция және мультиплексті нақты уақыттағы полимеразды тізбекті реакция (RT-PCR)

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, виرويد, 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*, bakytzhanovazhibek@gmail.com,
yerbolova.laura7@gmail.com, akbotarahatkyzy1@gmail.com, 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