

Сәкен Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университетінің Ғылым жаршысы: пәнаралық = Вестник науки Казахского агротехнического исследовательского университета имени Сакена Сейфуллина: междисциплинарный. – Астана: С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университеті, 2025. -№ 3 (127). - Р.126-137. - ISSN 2710-3757, ISSN 2079-939X

doi.org/10.51452/kazatu.2025.3(127).2009

УДК 606:632.913(045)

Исследовательская статья

Оптимизация протокола ПЦР-диагностики вириода веретеновидности клубней картофеля (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd)

Сүлейман М.А.¹ , Хасанов В.Т.¹ , Вологин С.Г.² 

¹Казахский агротехнический исследовательский университет имени С. Сейфуллина
Астана, Казахстан

²Татарский НИИ сельского хозяйства ФИЦ «Казанский научный центр РАН»
Казань, Россия

Автор-корреспондент: Сүлейман М.А.: suleiman_madina@mail.ru

Авторы: (1: ВХ) vadim_kazgatu@mail.ru; (2: СВ) semen_vologin@mail.ru

Получено: 03.07.2025 **Принято:** 28.08.2025 **Опубликовано:** 30.09.2025

Аннотация

Предпосылки и цель. Вириод веретеновидности клубней картофеля (далее - ВВКК, вириод) представляет собой новый опасный карантинный патоген, способный вызывать значительный ущерб сельскому хозяйству. Актуальной задачей является разработка молекулярной диагностики ВВКК для его раннего выявления. Целью настоящего исследования является оптимизация метода обратнотранскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с использованием специфичных праймеров для диагностики ВВКК.

Материалы и методы. Для диагностики ВВКК был проведен подбор праймеров PSTVd-for-XbaI, PSTVd-rev-BamHI, PS88M, PS89P, PS7P, PS7M, Vir1 и Vir2, которые специфичны к вириоду. В статье приводится краткая характеристика ОТ-ПЦР-диагностики отечественных и зарубежных образцов ВВКК. Также был изучен температурный градиент отжига праймеров для оптимизации реакции.

Результаты. Применение предложенной схемы ОТ-ПЦР, с использованием подобранных праймеров, показала высокую эффективность при диагностике ВВКК в растительном материале.

Закключение. Оптимизированные протокола ОТ-ПЦР с использованием специфичных праймеров может быть успешно применена для ранней диагностики ВВКК в растительном материале. Результаты исследования имеют важное значение для фитосанитарного мониторинга и контроля качества семенного картофеля в Республике Казахстан.

Ключевые слова: вириод веретеновидности клубней картофеля; диагностика; карантинный объект; обратнотранскриптазная полимеразная цепная реакция; праймер; секвенирование.

Введение

Согласно данным Бюро национальной статистики, производство картофеля в Республике Казахстане в 2024 году по сравнению с 2023 годом выросло на 28,7%. Валовой сбор за 2024 год составил 2 634,6 тыс. т [1]. Увеличились показатели экспорта картофеля по сравнению с импортом. Импорт уменьшился на 3,5% [2]. Посевная площадь картофеля в 2024 году в стране составила 122,6 тыс. гектаров. Вместе с увеличением производства картофеля, увеличивается потенциальный риск распространения поражающих его болезней. С каждым годом пополняется список опасных вредных организмов растительных культур для территории страны. Одним из новых таких организмов является ВВКК.

ВВКК – опасный патоген для пасленовых культур. Вириод – очень маленькая патогенная частица, принадлежит к группе поспивириодов. Большинство поспивириодов могут вызывать тяжелые заболевания и повреждения многих видов семейства *Solanaceae*, картофеля (*Solanum tuberosum*) и томата (*Solanum lycopersicum*), в частности, у которых они вызывают эпинастию, задержку роста, деформацию или обесцвечивание и некроз [3].

Риск, исходящий от ВВКК, и, следовательно, необходимость последовательных мер борьбы, в первую очередь, связаны с угрозой выращивания картофеля и томатов, где это может привести к экономическим потерям. В климатических условиях Казахстана поражение ВВКК возможно при выращивании томатов в теплицах и, возможно, также при выращивании картофеля на территории страны. ВВКК классифицируется как карантинный патоген, отсутствующий на территории страны. Патоген не может ни импортироваться, ни распространяться, что приводит к запрету на торговлю и перемещение растений и их частей, инфицированных ВВКК. Важное место в семеноводстве картофеля занимают специальные меры для импорта семенного картофеля и других пасленовых растений из других стран для посадки.

Заражение растения ВВКК может протекать бессимптомно на декоративных пасленовых культурах: в принципе существует риск того, что вирион может передаваться от бессимптомно инфицированных растений на подвой картофеля и томатов. Согласно данным мониторинговых исследований, проведенных в 2007 г., заражение пасленовых декоративных растений не привело к распространению ВВКК на другие культуры в Европейском союзе.

ВВКК представляет собой один из самых мелких патогенов из группы поспивиридов. Он состоит из одноцепочечного генетического материала (рибонуклеиновая кислота = РНК), который обычно состоит из 359 строительных блоков (нуклеотидов) и размножается только в подходящих клетках-хозяевах. Следует различать естественные растения-хозяева и растения-хозяева, которые могут быть заражены после искусственной инокуляции в экспериментах. Естественный диапазон растений-хозяев для ВВКК представляет собой картофель и другие виды *Solanum*, а также томаты, авокадо, однако ВВКК может быть экспериментально передан 94 видам из 31 семейства [4].

Предполагаемые риски при заражении и распространении организма обширны, учитывая информацию о потерях урожая от 20 до 70%, в отдельных случаях и до 100% [5]. Для избежания данной ситуации необходимо усилить заинтересованность действующих фитосанитарных рисков, тем самым призывая к принятию регулирующих мер, основанных на использовании размножения безвирионного материала и, по возможности, перехвате зараженных растений. Эффективность стратегии защиты требует быстрого и надежного метода для общего обнаружения и специфической идентификации вириона.

Правильно настроенные и проработанные протокола для всех стадий постановки ПЦР: выделение РНК, проведение обратной транскрипции и амплификация являются неотъемлемой составляющей для диагностики целого ряда организмов. Получение чистой РНК – это основополагающий этап эксперимента.

В настоящее время существует большое количество видов наборов и протоколов для выделения РНК и ДНК, в состав большинства которых входит тризол либо его модификации. В данной работе представлено сравнение метода выделения ВВКК с помощью нескольких готовых наборов и модифицированного нами варианта выделения РНК с применением тризола.

Существующие коммерческие готовые ПЦР-тесты дорогостоящи, трудоемки и привязаны к бренду. В случае необходимости заменить или дополнить один из необходимых компонентов набора практически невозможно.

Схожие недостатки можно отметить и у готовых наборов обратной транскрипции (ОТ): набор может быть не специфичен к изучаемому объекту исследований и требовать оптимизации режима постановки или подбор специфических праймеров. При преждевременном расходе обратной транскриптазы ее замена не предусматривается, набор далее не функционален.

Значимый этап проводимого анализа – постановка амплификации, оптимизация протокола которой является трудоемкой задачей. Помимо подбора количества добавляемых основных компонентов требуется подбор специфических праймеров. Зачастую, протокола, описанные в статьях ученых, изучающих определенные пары праймеров, не всегда актуальны в работе других исследователей. Программы амплификации могут различаться в зависимости от возможностей используемого термоциклера, что может привести к получению отрицательных или ложноположительных результатов.

В этой связи оптимизация праймеров, специфических к ВВКК на примере обнаруженных изолятов на территории страны, оптимизация протокола диагностики к более доступному применению являются весьма актуальной задачей.

Целью настоящей работы являлась оптимизация протокола выделения, обратной транскрипции и амплификации ВВКК с использованием подобранных видоспецифических праймеров.

Материалы и методы

Источник материалов. Клубневой материал картофеля был наработан в процессе исследований методом визуальной оценки пораженности образцов картофеля ВВКК, согласно общепринятым протоколам [3, 6, 7, 8]. Отдельные образцы, зараженные ВВКК, были любезно предоставлены Татарским научно-исследовательским институтом сельского хозяйства Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр РАН» и сотрудниками РГП на ПХВ «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина».

Выделение РНК для сравнения производили тремя способами из картофельного материала:

- с применением коммерческих наборов: комплекта реагентов для выделения РНК «Проба-НК» (Агродиагностика, РФ) и комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК «Рибо-сорб» (Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии», РФ);

- с помощью оптимизированного метода выделения РНК ВВКК с применением тризола на основе внесенных модификаций в существующие методы выделения РНК.

При использовании комплекта «Проба-НК» проведение работ осуществлялось в соответствии с протоколом производителя. Протокол выделения РНК ВВКК с применением комплекта «Рибо-сорб» для оптимальной работы требовал определенной модификации, в связи с тем, что результаты исследований отображались приглушенно выражено на получаемых электрофореграммах.

Для оптимизации выделения РНК применяли метод с применением тризола, который также был дополнительно модифицирован. Образцы доводили до гомогенного состояния. После добавления тризола к изучаемому растительному материалу, пробирки вортексировали и далее центрифугировали. Затем добавляли хлороформ, оставляли на 2-3 мин и центрифугировали в течение 10 мин при 4 °С и 12 тыс. об/мин. Супернатант переносили в новые пробирки. На следующем этапе добавляли в пробирки изопропанол для преципитации и помещали образцы на холод при температуре 4 °С. Далее образцы центрифугировали в течение 10 мин при температуре 4 °С и 12 тыс. об/мин, удаляя надосадочную жидкость. К полученному осадку добавляли 70% этиловый спирт, далее образцы центрифугировали в течение 10 мин при 4 °С и 12 тыс. об/мин. Надосадочную жидкость удаляли и подсушивали при комнатной температуре. В конце в пробирки добавляли 100 мкл деионизированной воды и помещали в термостат на 10 мин при 55 °С до растворения. Все вышеперечисленные этапы выделения проводили при комнатной температуре.

Для обратной транскрипции применялись следующие коммерческие наборы: комплект реагентов для проведения обратной транскрипции (Агродиагностика, РФ) и комплект реагентов для получения к ДНК на матрице РНК «РЕВЕРТА-L» (ФГУН ЦНИИЭ, РФ). При работе с комплектом «РЕВЕРТА-L» реакцию ОТ проводили в соответствии с скорректированной инструкцией и дополнительным внесением специфических праймеров.

В процессе проведенного анализа литературных данных нами были отобраны праймеры, наиболее информативно соответствующие детекции ВВКК в образцах картофеля (таблица 1).

Таблица 1 – Последовательность изучаемых праймеров, применяемых для детекции ВВКК

Наименование	Последовательность праймеров	Размер ПЦР-продукта
Vir1	5'-cttcagtgttttccaccggtag-3'	262 п.н.
Vir2	5'-ttcctgtggtgcactctgacc-3'	
PSTVd-for-XbaI	5'-ctatctagaccggggaacctgga-3'	360 п.н.
PSTVd-rev-BamHI	5'-ctaggatccctgaagcgctccccga-3'	
PS88M	5'-ccctgaagcgctcctccgag-3'	359 п.н.
PS89P	5'-atccccggggaacctggagcgaac-3'	
PS7P	5'-ggttcctgtggttcacacgtg-3'	351 п.н.
PS7M	5'-gaaccaactgcggtccaagg-3'	

ОТ-ПЦР проводили на амплификаторе T100 (BioRad, США). Протокола проведения ПЦР соответствовали методикам, описанным в работах с использованием следующих праймеров: Vir1/Vir2 [9]; PSTVd-for-XbaI/PSTVd-rev-BamHI [10]; PS7P/PS7M [11] и PS88M/PS89P [11]. Также использовали реактивы производства Сибэнзим и Bio-Rad.

Исследования проводились на базе Лаборатории биотехнологии растений и молекулярной диагностики фитопатогенов Кафедры биологии, защиты и карантина растений НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет им. С.Сейфуллина» и ТОО «Национальный центр биотехнологии» в рамках докторской диссертационной работы: «Взаимодействие вириода веретеновидности клубней картофеля с вирусными патогенами и растениями-хозяевами семейства Solanaceae» и проекта BR22887230 «Проведение апробации современных методов диагностики карантинных вредных организмов» программно-целевого финансирования МСХ РК «Создание эффективной системы управления численностью популяций карантинных вредных организмов, ограничено распространенных на территории РК».

Результаты и обсуждение

ВВКК является возбудителем одной из новых быстро распространяющихся и вредоносных болезней [12, 13]. С каждым годом на карте распространения можно наблюдать увеличивающиеся площади и новые точки диагностики данного объекта. В то же время, в ограниченных условиях диагностирование и мониторинг ВВКК относительно трудоемки и затратны. Вироид не всегда проявляет типичные симптоматические признаки заражения, также его легко спутать с сортовыми особенностями клубневого материала картофеля. Эти особенности указывают на необходимость лабораторного диагностирования для получения точного и оперативного результата. Методом ОТ-ПЦР можно обнаружить небольшие молекулы возбудителя в исследуемых образцах, но для достоверного результата необходимо правильно подобрать и оптимизировать протокола диагностики.

Существующие в настоящее время коммерческие ПЦР-тест-системы для детекции ВВКК обладают достаточно высокой специфичностью и чувствительностью. Однако для серийных анализов в связи с их дороговизной и конфиденциальностью более привлекательным является оптимизация протоколов ПЦР-диагностики образцов, инфицированных вириодом с помощью разработанных ранее праймеров.

В этой связи, нами был проведен анализ протоколов выделения РНК коммерческим наборами в сравнении с модифицированным способом.

На рисунке 1 представлены результаты электрофореграммы образцов РНК, выделенной с помощью трех изучаемых способов коммерческих наборов «Проба-НК», «Рибо-сорб» и оптимизированного протокола выделения РНК с применением тризола. Коммерческие наборы также сравнивали между собой для подбора более подходящего варианта с учетом соотношения цены/качество при возможном масштабировании объемов исследуемых образцов.

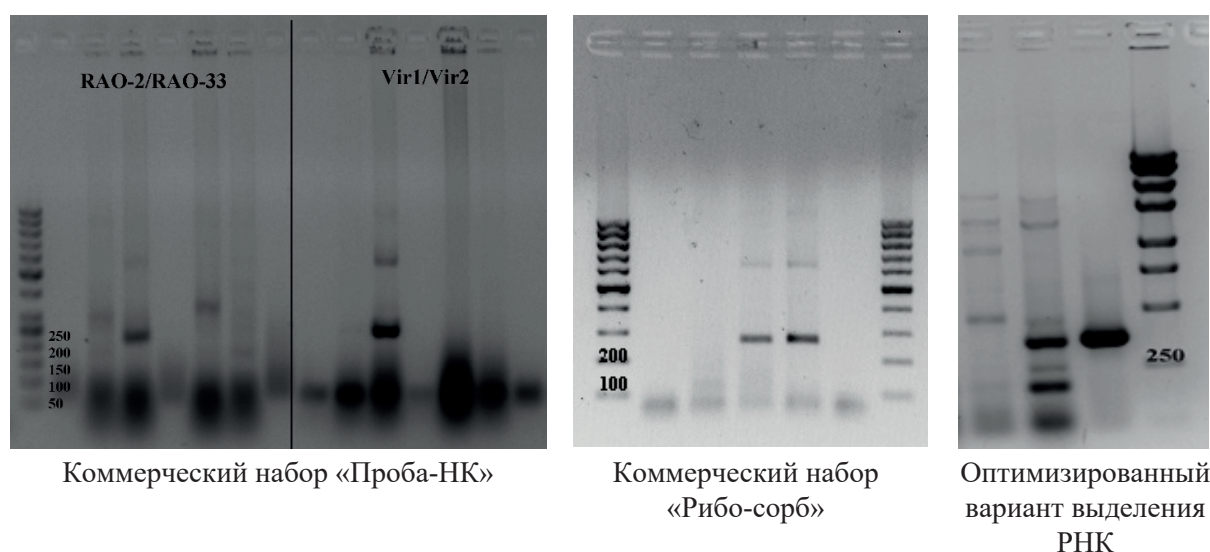


Рисунок 1 – Результаты электрофореграммы образцов РНК ВВКК, выделенных с помощью коммерческих наборов «Проба-НК», «Рибо-сорб» и оптимизированного варианта выделения РНК с применением тризола

При проведении ПЦР анализа изучаемых образцов с применением комплекта «Проба НК» и комплекта реагентов для проведения обратной транскрипции (Агродиагностика) на электрофореграммах не было четких линий, соответствующих контролям. В исследованиях, проводимых с применением комплекта «Рибо-сорб» и с помощью оптимизированного варианта выделения РНК, фрагменты ДНК на электрофореграммах проявлены лучше. Результаты, полученные с помощью предложенного оптимизированного метода выделения РНК вириона, сопоставимы с данными, полученными с помощью комплекта «Рибо-сорб». Наличие необходимого оборудования и дорогостоящих реагентов для данного варианта выделения РНК облегчит и наладит процесс выделения, снизит затраты на приобретение готовых коммерческих наборов. Для сравнения на сумму одного флакона тризола объемом 100 мл можно приобрести 3-4 коммерческих набора, рассчитанного на 100 образцов каждый. Следует отметить, что необходимо соблюдать все требования к применению данных реагентов для обеспечения безопасности в лабораторных условиях, а для этого в лаборатории должен быть вытяжной шкаф и иное оборудование, необходимое для соблюдения техники безопасности при работе с тризолом и другими реагентами.

Для достижения более точных и выраженных результатов на электрофореграмме мы модифицировали несколько пунктов в протоколе выделения РНК (таблица 2).

Таблица 2 – Характеристика оригинального и модифицированного протоколов выделения РНК ВВКК из образцов картофеля

Протокол для выделения РНК/ДНК «Рибо-сорб»	Модифицированный протокол для выделения РНК «Рибо-сорб»
1. Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 (если они хранились при температуре от 2 до 8 °C) прогреть при температуре от 60 до 65 °C до полного растворения кристаллов. 2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок (включая отрицательный и положительный контроли выделения). Внести в каждую пробирку 5 мкл ВКО (если он предусмотрен для анализа данного возбудителя инфекции). Затем по 450 мкл лизирующего раствора. Промаркировать пробирки. 3. В пробирки с лизирующим раствором и ВКО (если используется) внести по 100 мкл пробы, используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести 100 мкл ОК. В пробирку положительного контроля (ПК) выделения внести 90 мкл ОК и 10 мкл ПК (если он предусмотрен для анализа). 4. Плотные закрытые пробы тщательно перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 с при 5 тыс. об/мин на микроцентрифуге для удаления капель со внутренней поверхности крышки пробирки. (данный фрагмент текста может не пройти антиплагиат)	1. Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 (если они хранились при температуре от 2 до 8 °C) прогреть при температуре от 60 до 65 °C до полного растворения кристаллов. 2. 50 мкл лизирующего раствора добавить в 1,5 мл пробирку Эппендорфа с образцом и гомогенизировать с помощью стерильного пестика, отдельного для каждого образца. 3. Добавить к гомогенизированному образцу 450 мкл лизирующего раствора, перемещать на вортексе и поместить в термостат на 10 мин при 60 °C. 4. Центрифугировать 7 мин при 5000 об/мин и перенести супернатант в новые промаркированные пробирки Эппендорфа.

Для проведения дальнейшей ОТ образцов РНК ВВКК, выделенных двумя способами, применяли комплект реагентов «РЕВЕРТА-L».

Детали оптимизации протокола проведения ОТ для изучаемых образцов представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Характеристика оригинального и модифицированного протоколов получения кДНК из выделенной РНК ВВКК

Протокол комплекта реагентов для получения кДНК на матрице РНК «РЕВЕРТА-L»	Модифицированный протокол комплекта реагентов для получения кДНК на матрице РНК «РЕВЕРТА-L»
1. Приготовить реакционную смесь на 12 реакций. Для этого в пробирку с RT-mix внести 5 мкл RT-G-mix-1, тщательно перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием. 2. К полученному раствору добавить 6 мкл ревертазы (MMIv), пипетировать 5 раз, перемешать на вортексе. Осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием. 3. Внести в пробирки по 10 мкл готовой реакционной смеси. 4. Используя наконечники с аэрозольным барьером, добавить по 10 мкл РНК-пробы в пробирки с реакционной смесью. Осторожно перемешать пипетированием. 5. оставить пробирки в амплификатор (термостат) с температурой 37 °С на 30 мин. 6. Полученную в реакции обратной транскрипции кДНК для последующей постановки ПЦР развести в 2 раза ДНК буфером (к 20 мкл кДНК отдельным наконечником с аэрозольным барьером добавить 20 мкл ДНК-буфера, аккуратно перемешать пипетированием 10 раз).	1. К 9 мкл РНК-пробы добавить по 0,5 мкл прямого и обратного праймеров каждого 2. Перенести пробирки в амплификатор (термостат) с температурой 70 °С на 2 мин, 50 °С на 5 мин. 3. В пробирку добавить 10,4 мкл RT-mix, 0,41 мкл RT-G-mix-1 и 0,5 мкл ревертазы (MMIv). 4. Поставить пробирки в амплификатор (термостат) с температурой 37 °С на 50 мин.

После получения кДНК была проведена амплификация. При работе с большим количеством циклов, как в проводимом эксперименте, увеличивается вероятность возникновения неспецифической амплификации. В связи с этим, для получения четко выраженных результатов на данном этапе исследований проводили оптимизацию работы праймеров.

Для оптимизации условий ПЦР нами был проведен ряд экспериментов, в ходе которых были установлены варианты постановки ПЦР с соответствующими протоколами для подобранных праймеров. При этом были изучены следующие параметры: количество циклов амплификации, время денатурации, температура отжига праймеров, заявленные в протоколах постановки ПЦР для каждой пары праймеров.

В результате анализа различных литературных источников нами была сведена детальная информация о режимах постановки ОТ-ПЦР (таблица 4).

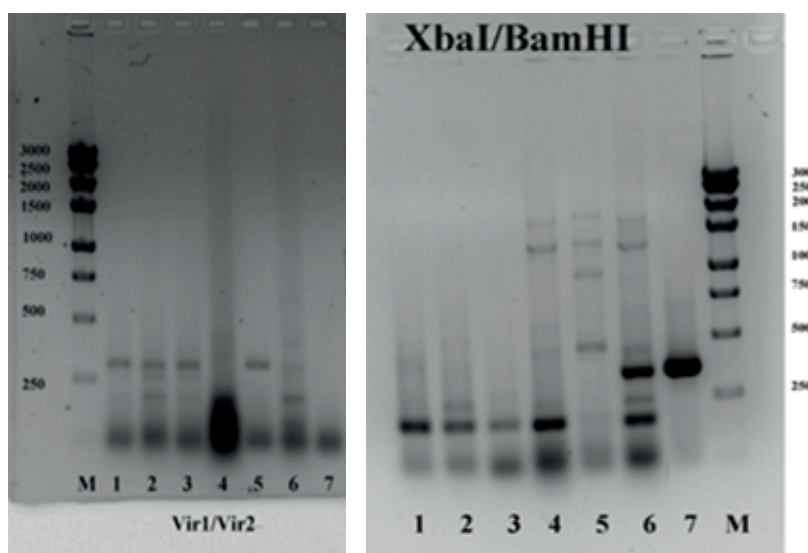
Таблица 4 – Температурно-временной режим амплификации фрагментов ВВКК

Наименование	Стадии амплификации	Температура	Время	Количество циклов
Vir1/Vir2	Денатурация	95 °С	1 мин	30
	Отжиг	59 °С	1,5 мин	
	Элонгация	72 °С	1 мин	
	Финальная элонгация	72 °С	7 мин	1

Продолжение таблицы 4

PSTVd-for-XbaI/PSTVd-rev-BamHI	Денатурация	94 °C	1 мин	30
	Отжиг	60 °C	1 мин	
	Элонгация	72 °C	1 мин	
	Финальная элонгация	72 °C	5 мин	1
PS88M/PS89P	Денатурация	95 °C	30 сек	35
	Отжиг	62 °C	30 сек	
	Элонгация	72 °C	45 сек	
	Финальная элонгация	72 °C	7 мин	1
PS7P/PS7M	Денатурация	94 °C	30 сек	35
	Отжиг	57 °C	1 мин	
	Элонгация	72 °C	1 мин	
	Финальная элонгация	72 °C	8 мин	1

На рисунках 2 и 3 представлены результаты постановки ОТ-ПЦР исследуемых образцов на основании вышеприведенных протоколов.



А - Vir1/Vir2

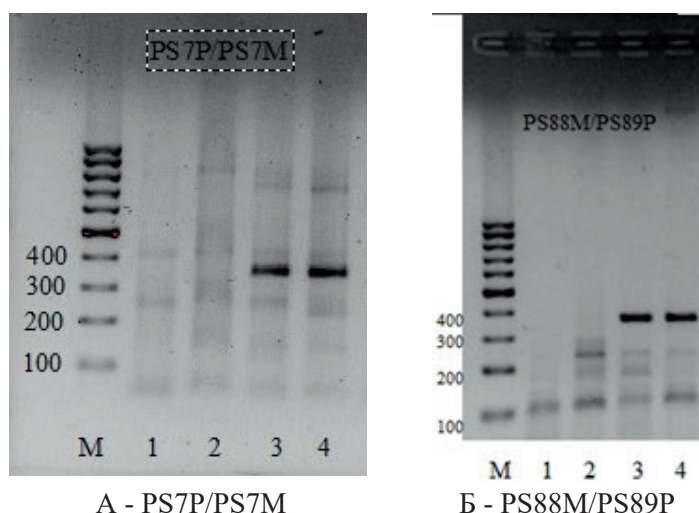
Б - PSTVd-for-XbaI/PSTVd-rev-BamHI

1 – Агрономический; 2 – Жуковский; 3 – Кураж; 4 – Спиридон;
5 – Коломбо, 6 - KZ 270704, 7 - Положительный контроль

Рисунок 2 – Результаты полученных ПЦР-продуктов изолятов ВВКК в агарозном геле

При работе с парой праймеров PSTVd-for-XbaI/PSTVd-rev-BamHI (360 п.н.) фрагмент НК 6-го образца - KZ 270704 как и 7-го образца (положительный контроль) проявились на электрофореграммах, однако 1-5 образцы (Агрономический, Жуковский, Кураж, Спиридон, Коломбо), несмотря на их пораженность ВВКК, показали отрицательную реакцию.

Образцы 1-3 и 5 (Агрономический, Жуковский, Кураж, Спиридон) были идентифицированы с помощью праймеров Vir1/Vir2 (262 п.н.), однако подтвержденный выше образец 6 и положительный контроль не проявились.



1 – Тохтар1, 2 – Тохтар 2, 3 – Тохтар 3, 4 – Спиридон

Рисунок 3 – Результаты полученных ПЦР-продуктов изолятов ВВКК в агарозном геле

При работе с праймерами PS7P/PS7M и PS88M/PS89P фрагменты НК образцов 3, 4 (Тохтар 3 и Спиридон) проявились на электрофореграммах. Образцы 1 и 2 (Тохтар 1 и Тохтар 2), собранные с одного куста, как и Тохтар 3, не содержали вирион.

Для получения более четких бэндов электрофореграмм нами было решено поставить температурный градиент для трех пар праймеров и внести корректировки в протокол амплификации для пары праймеров Vir1/Vir2 (таблица 5).

Таблица 5 – Исследуемые температурные режимы амплификации фрагментов ВВКК с учетом корректировок

Наименование	Стадии амплификации	Температура	Время	Количество циклов
Vir1/Vir2	Денатурация	95 °C	1 мин	35
	Отжиг	60 °C; 59,7 °C; 59 °C; 58,1 °C; 57 °C; 56,1 °C; 55,4 °C; 55 °C	1 мин	
	Элонгация	72 °C	1 мин	
	Финальная элонгация	72 °C	5 мин	1
PS88M/PS89P	Денатурация	95 °C	30 сек	35
	Отжиг	66 °C; 65,4 °C; 64,4 °C; 62,9 °C; 61,1 °C; 59,6 °C; 58,6 °C; 58 °C	30 сек	
	Элонгация	72 °C	45 сек	
	Финальная элонгация	72 °C	7 мин	1
PS7P/PS7M	Денатурация	94 °C	30 сек	35
	Отжиг	53,1 °C; 53,7 °C; 55,1 °C; 57 °C; 59,4 °C; 61,4 °C; 62,5 °C; 63,1 °C	1 мин	
	Элонгация	72 °C	1 мин	
	Финальная элонгация	72 °C	8 мин	1

Исследование температурного градиента амплификации проводилось на изоляте ВВКК Жуковский (рисунок 4).

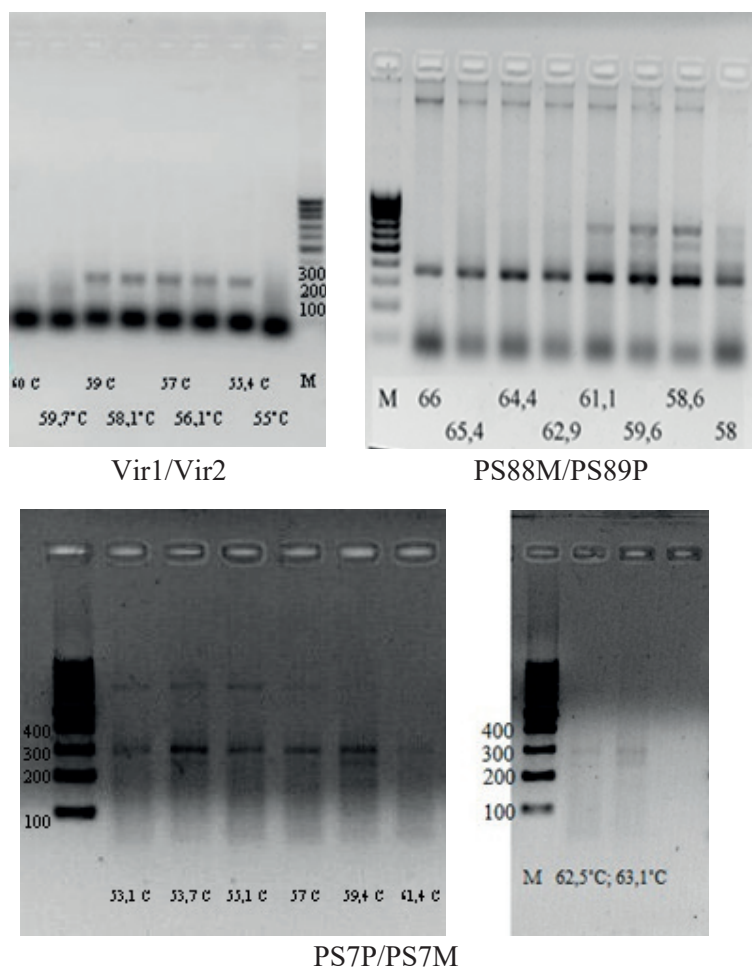


Рисунок 4 – Результаты полученных ПЦР-продуктов
изолята ВВКК Жуковский в агарозном геле

Данные рисунка 3 показали, что амплификацию с применением пары праймеров Vir1/Vir2 (262 bp) для диагностики ВВКК следует проводить при 56,1 °C, в сравнении с заявленными 59 °C [9]. Заявленная температура отжига 60 °C для пары праймеров XbaI/BamHI (360 bp) оптимальна [10]. Две пары праймеров PS88M/PS89P с оптимальной температурой 66 °C и 53,7 °C для PS7P/PS7M по сравнению с заявленными 62 °C и 57 °C [11] соответственно, также рекомендуются и для проведения секвенирования образцов.

Заключение

Преимуществом оптимизированного протокола диагностики ВВКК является простой и малозатратный способ выделения РНК и относительная доступность по цене по сравнению с альтернативными подходами. Основным относительным недостатком являются затратность и требование в хранении исходных реактивов, при требуемых режимах согласно инструкции. Этот метод позволяет получить РНК на достаточном уровне, который можно достичь с помощью коммерческих наборов.

Несмотря на то, что протокол, приложенный к набору, подвергся незначительным поправкам, наиболее оптимальным выбран коммерческий набор «Рибо-сорб» (ФГУН ЦНИИЭ, РФ).

В дополнении к нему выделенные образцы использовали для получения кДНК с применением коммерческого набора «РЕВЕРТА-L» (ФГУН ЦНИИЭ, РФ).

Исследования с применением пар праймеров для детекции ВВКК (Vir1/Vir2, PSTVd-for-XbaI/PSTVd-rev-BamHI, PS88M/PS89P, PS7P/PS7M) показали наиболее объективные результаты диагностики изучаемых изолятов после внесения корректировок в протокола амплификации.

Для трех из них была адаптирована оптимальная температура отжига праймеров. Для пары праймеров Vir1/Vir2 скорректированы: количество циклов амплификации – 35 циклов, в сравнении с заявленными 30 циклами, продолжительность отжига с 1,5 мин на 1 мин и продолжительность финальной элонгации с 7 мин на 5 мин. Проведение амплификации с применением пары праймеров Vir1/Vir2 (262 bp) оптимально при температуре 56,1 °С. Пара праймеров XbaI/BamHI (360 bp) эффективно работала при заявленной температуре 60 °С.

Установлено, что для подтверждения диагностики ВВКК в образцах картофеля с применением пары праймеров PS88M/PS89P оптимальна температура 66 °С, по сравнению с заявленной 62 °С. Праймеры PS7P/PS7M более эффективно проявлялись при температуре 53,7 °С.

Отработанная программа диагностики ВВКК может способствовать ускорению процесса диагностики при обнаружении очагов заражения; повышению точности и чувствительности тестирования, что важно для правильной диагностики и проведения последующих исследований; может уменьшить количество ложноположительных результатов и позволит выбрать наиболее актуальные протокола для постановки ОТ-ПЦР для детекции ВВКК.

Вклад авторов

МС, ВХ, СВ: участвовали в сборе и подготовке образцов для ПЦР-диагностики ВВКК. МС: выполнила лабораторные анализы методом ОТ-ПЦР, провела обработку данных и анализ результатов диагностики. МС, ВХ, СВ: подготовили литературный обзор, изложили результаты исследований, выполнили анализ данных и подготовили статью. МС, ВХ, СВ: провели окончательную редакцию и вычитку. Все авторы прочитали, просмотрели и одобрили окончательную редакцию рукописи.

Информация о финансировании

Исследования проводились в рамках программно-целевого финансирования МСХ РК на 2024-2026 годы программы BR22887230 «Создание эффективной системы управления численностью популяций карантинных вредных организмов, ограничено распространенных на территории РК», по проекту: «Проведение апробации современных методов диагностики карантинных вредных организмов» и докторской диссертационной работы на тему «Взаимодействие вириоида веретеновидности клубней картофеля с вирусными патогенами и растениями-хозяевами семейства Solanaceae».

Благодарность

Авторы выражают благодарность сотрудникам и заведующему Лаборатории прикладной генетики ТОО «Национальный центр биотехнологии» (НЦБ) Шевцову А.Б. за предоставление лабораторных ресурсов, ценные рекомендации по оптимизации протокола ОТ-ПЦР-диагностики ВВКК и поддержку в проведении исследований.

Список литературы

- 1 Валовый сбор сельскохозяйственных культур в Республике Казахстан. (2024). Бюро национальной статистики Агентства по стратегическому планированию и реформам Республики Казахстан. <https://stat.gov.kz/ru/industries/business-statistics/stat-forrest-village-hunt-fish/publications/113764/>.
- 2 Экспорт и импорт товаров продукции растениеводства. (2025). Бюро национальной статистики Агентства по стратегическому планированию и реформам Республики Казахстан. <https://stat.gov.kz/api/iblock/element/4099/file/ru/>.
- 3 МСФМ 27. (2016). Приложение 7 – Вириод веретеновидности клубней картофеля. Рим: МККЗР, ФАО, 29.
- 4 EPPO. (2004). PM 7/33(1) – Diagnostic protocols for regulated pests. Potato spindle tuber pospiviroid. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 34, 257-269.

- 5 Verhoeven, JThJ. (2012). Potato spindle tuber viroid (spindle tuber of potato). *CABI Compendium*, 43659. DOI: 10.1079/cabicompendium.43659.
- 6 EPPO. (2011). PM 9/13 (1) – National regulatory control systems. Potato spindle tuber viroid on potato. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 41, 394-399.
- 7 Гирсова, НВ. (2003). *Вироид веретеновидности клубней картофеля: диагностика, сохранение инфекционности и особенности передачи патогенна*. Большие Вяземы: ВНИИФ, 5-10.
- 8 EPPO. (2021). PM 7/138 (1) – Pospiviroids (genus Pospiviroid). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 51, 144-177.
- 9 Mumford, RA, Walsh, K., Boonham, NA. (2000). A comparison of molecular methods for the routine detection of viroids. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 30, 431-435.
- 10 Nadirova, LT, Stanbekova, GE, Beisenov, DK, Iskakov, BK. (2016). Molecular diagnostics for the potato spindle tuber viroid in the Republic of Kazakhstan. *Biotechnology. Theory and Practice*, 3, 46-50.
- 11 Tsushima, T., Murakami, S., Ito, H., et al. (2011). Molecular characterization of Potato spindle tuber viroid in dahlia. *J Gen Plant Pathol*, 77, 253-256.
- 12 EPPO. (2024). PM 1/2 (33) - EPPO A1 and A2 lists of pests recommended for regulation as quarantine pests. EPPO Standards, 20.
- 13 Soliman, T., Mourits, MCM, Oude Lansink, AGJM, van der Werf, W. (2012). Quantitative economic impact assessment of an invasive plant disease under uncertainty – A case study for potato spindle tuber viroid (PSTVd) invasion into the European Union. *Crop Protection*, 40, 28-35.

References

- 1 *Valovyi sbor sel'skhozjaistvennykh kul'tur v Respublike Kazahstan*. (2024). Byuro nacional'noi statistiki Agentstva po strategicheskomu planirovaniyu i reformam Respubliki Kazahstan. <https://stat.gov.kz/ru/industries/business-statistics/stat-forrest-village-hunt-fish/publications/113764/>.
- 2 *Eksport i import tovarov produktsii rasteniyevodstva*. (2025). Byuro nacional'noi statistiki Agentstva po strategicheskomu planirovaniyu i reformam Respubliki Kazahstan. <https://stat.gov.kz/api/iblock/element/4099/file/ru/>.
- 3 MSFM 27. (2016). *Prilozhenie 7 – Viroid veretenovidnosti klubnej kartofelja*. Rim: MKKZR, FAO, 29.
- 4 EPPO. (2004). PM 7/33(1) – Diagnostic protocols for regulated pests. Potato spindle tuber pospiviroid. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 34, 257-269.
- 5 Verhoeven, JThJ. (2012). Potato spindle tuber viroid (spindle tuber of potato). *CABI Compendium*, 43659. DOI: 10.1079/cabicompendium.43659.
- 6 EPPO. (2011). PM 9/13 (1) – National regulatory control systems. Potato spindle tuber viroid on potato. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 41, 394-399.
- 7 Girsova, NV. (2003). *Viroid veretenovidnosti klubnei kartofelya: diagnostika, sohranenie infekcionnosti i osobennosti peredachi patogenna*. Bolshye Vyazemy: VNIIF, 5-10.
- 8 EPPO. (2021). PM 7/138 (1) – Pospiviroids (genus Pospiviroid). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 51, 144-177.
- 9 Mumford, RA, Walsh, K., Boonham, NA. (2000). A comparison of molecular methods for the routine detection of viroids. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 30, 431-435.
- 10 Nadirova, LT, Stanbekova, GE, Beisenov, DK, Iskakov, BK. (2016). Molecular diagnostics for the potato spindle tuber viroid in the Republic of Kazakhstan. *Biotechnology. Theory and Practice*, 3, 46-50.
- 11 Tsushima, T., Murakami, S., Ito, H., et al. (2011). Molecular characterization of Potato spindle tuber viroid in dahlia. *J Gen Plant Pathol*, 77, 253-256.
- 12 EPPO. (2024). PM 1/2 (33) - EPPO A1 and A2 lists of pests recommended for regulation as quarantine pests. EPPO Standards, 20.
- 13 Soliman, T., Mourits, MCM, Oude Lansink, AGJM, van der Werf, W. (2012). Quantitative economic impact assessment of an invasive plant disease under uncertainty – A case study for potato spindle tuber viroid (PSTVd) invasion into the European Union. *Crop Protection*, 40, 28-35.

Картоп түйнектері виroidының ПТР диагностикасына арналған хаттаманы оңтайландыру (*Potato spindle tuber viroid, PSTVd*)

Сүлейман М.А., Хасанов В.Т., Вологин С.Г.

Түйін

Алғышарттар мен мақсат. Картоп түйнектерінің виroidі (бұдан әрі - КТВ, виroid) - бұл ауыл шаруашылығына айтарлықтай зиян келтіретін жаңа қауіпті карантиндік патоген. Зерттеу жұмысының өзектілігі – КТВ-ын ерте анықтау молекулалық диагностикасын әзірлеу. Осы зерттеудің мақсаты КТВ-ының ПТР диагностикасы үшін арнайы праймерлерді пайдалана отырып, кері транскрипцияны (КТ-ПТР) жүргізуді оңтайландыру.

Материалдар мен әдістер. КТВ-ын диагностикалау үшін PSTVd-for-XbaI, PSTVd-rev-BamHI, PS88M, PS89P, PS7P, PS7M, Vir1, Vir2 виroidқа тән праймерлері таңдалды. Мақалада отандық және шетелдік КТВ үлгілерінің КТ-ПТР диагностикасына қысқаша сипаттама келтірілген. Реакцияны оңтайландыру үшін праймерлерді күйдіру (отжиг) температурасының градиенті де зерттелді.

Нәтижелер. Өсімдік материалынан КТВ-ын диагностикалауда таңдалған праймерлерді қолдана отырып, ұсынылған КТ-ПТР схемасын қолдану арқылы жоғары әрі тиімді нәтижеге қол жеткізілді.

Қорытынды. Өсімдік материалындағы КТВ-ын мамандандырылған арнайы праймерлер мен оңтайландырылған КТ-ПТР протоколдарын қолдану арқылы ерте диагностикалауда сәтті нәтижеге қол жеткізуге мүмкіндік береді. Зерттеу нәтижелері Қазақстан Республикасының тұқымдық картоптың сапасы мен фитосанитариялық мониторингін бақылауда үлкен маңызға ие.

Кілт сөздер: картоп түйнектерінің виroidы; диагностика; карантиндік нысан; полимеразды тізбекті реакцияның кері транскрипциясы; праймерлер; секвенирлеу.

Optimization of the protocol for PCR diagnosis of Potato tuber spindle viroid (*Potato spindle tuber viroid, PSTVd*)

Madina A. Suleiman, Vadim T. Khassanov, Semyon G. Vologin

Abstract

Background and Aim. Potato tuber spindle viroid (hereinafter - PSTVd, viroid) is a dangerous quarantine pathogen capable of causing significant economic losses in agriculture. An urgent task is the development of a molecular diagnostic method for PSTVd to ensure its early detection. The aim of this study was to optimize the reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) method using specific primers for the diagnosis of PSTVd.

Materials and Methods. For the diagnosis of PSTVd, primers PSTVd-for-XbaI, PSTVd-rev-BamHI, PS88M, PS89P, PS7P, PS7M, Vir1, and Vir2, which are specific to viroid, were selected. This article provides a brief description of RT-PCR diagnostics of both domestic and foreign samples of PSTVd. The temperature gradient of primer annealing was also studied to optimize the reaction.

Results. The application of the proposed RT-PCR scheme using selected primers demonstrated high efficiency in diagnosing of PSTVd in plant material.

Conclusion. The optimized RT-PCR protocols using specific primers can be successfully applied for early diagnosis of PSTVd in plant material. The results of the study are important for phytosanitary monitoring and quality control of seed potatoes in the Republic of Kazakhstan.

Keywords: potato tuber spindle viroid; diagnosis; quarantine object; reverse transcriptase polymerase chain reaction; primer; sequencing.