

Определение новых рекомбинантных штаммов Y вируса картофеля для дизайна двуцепочечной РНК

В.О. Самарская^{1*}, Н.О. Калинина^{1,2}, М.Э. Тальянский¹

¹ Институт биоорганической химии им. М.М. Шенякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

² Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

* viktoriya.samarskaya2012@yandex.ru

Цель: Изучение организации геномов новых рекомбинантных штаммов Y вируса картофеля (PVY) для идентификации консервативных последовательностей с целью создания РНК-препаратов, эффективных против всех известных штаммов PVY для защиты растений картофеля.

Материалы и методы: Клубни картофеля, полученные в полевых условиях, были собраны в Астраханской области. Апикальные почки, вырезанные из клубней, проращивали в теплице при температуре 21–22 °С. Образцы для выделения РНК отбирали на стадии 5–8 листьев проростков через 3–4 недели после посадки. Выделение РНК проводили согласно методики, описанной в работе Samarskaya et al. (2023). Секвенирование полиаденилированной фракции РНК выполнено на платформе Illumina NovaSeq 6000 и проведен биоинформатический анализ данных.

Результаты: Собраны вирусные контиги *de novo* из NGS библиотек клубневых полевых образцов картофеля. Помимо известных рекомбинантных геномов PVY разных типов (Samarskaya et al., 2023), мы обнаружили два контига, демонстрирующих более низкую гомологию (97–98%) с известными изолятами PVY из GenBank, которые содержали неизвестные комбинации участков родительских типов PVY (PVY^N и PVY^O). Новые контиги мы обозначили как Ast-A-I и Ast-A-II. Для филогенетического и рекомбинационного анализа контигов PVY использовали репрезентативную выборку полных геномных последовательностей всех известных типов PVY и их рекомбинантов из базы данных NCBI. Исследование показало, что две точки рекомбинации (RJ) в новых геномах PVY располагались в стандартных позициях 2,390 нт и 9,200 нт, где 5'-конец принадлежал PVY^N, а 3'-конец – PVY^O. В изоляте Ast-A-II дополнительно обнаружена точка рекомбинации в позиции 500 нт с обратным расположением родительских последовательностей (5'-PVY^O/3'-PVY^N). Особый интерес представляет новая, ранее не описанная RJ в позиции 7,850 нт генома PVY. Для верификации результатов биоинформатического анализа проведена ОТ-ПЦР и секвенирование по Сэнгеру участков, включающих точки рекомбинации в вирусных последовательностях Ast-A-I и Ast-A-II. Результаты показали идентичность 99,7 и 100% с соответствующими контигами. Поскольку новые рекомбинанты между собой различаются только в 5'-концевой области, их последовательности полностью совпадают в точках рекомбинации 7,850 и 9,200 нт. Анализ ПЦР-продуктов подтвердил высокую степень идентичности с исходными последовательностями: для участка, содержащего точку рекомбинации 7,850 нт, идентичность составила 99,8%; для участка с точкой рекомбинации 9,200 нт наблюдалась 97,8% идентичность с рекомбинантными контигами. Небольшие различия в идентичности (97,8% для RJ 9,200 нт) могут отражать естественный полиморфизм вирусной популяции или технические особенности секвенирования. Затем для поиска консервативного участка в геноме PVY с учетом геномов 10 известных рекомбинантных вирусных изолятов и двух новых рекомбинантных геномов PVY был проделан анализ с использованием авторского скрипта.

Выводы: В проростках клубней картофеля из Астраханской области обнаружены два новых рекомбинантных варианта вируса Y картофеля. Эти варианты образовались в результате рекомбинаций между уже существующими рекомбинантными штаммами PVY, а не между «родительскими» штаммами PVY^N и PVY^O. Выявленный сайт рекомбинации в позиции 7850 нт, расположен в гене РНК-зависимой РНК-полимеразы. Данный участок (7850–9200 нт) включает переходную зону между генами РНК-полимеразы и белка оболочки, которая является одной из наиболее вариабельных областей генома потивирусов. Новые штаммы Ast-A-I и Ast-A-II могли первоначально сформироваться в других растениях-хозяевах, характерных для Астраханского региона, с последующей передачей на картофель посредством тлей. Выявление и анализ специфических участков рекомбинации в геноме PVY имеет важное значение для разработки эффективных методов диагностики и создания «зеленых» стратегий для контроля распространения патогена и эффективного подавления его в сельскохозяйственных культурах.

Финансирование: Исследование поддержано Российским научным фондом, грант № 23-74-30003, <https://rscf.ru/project/23-74-30003/>.