

АНДАТПА

«6D070100 – Биотехнология» мамандығы бойынша
философия докторы (Ph.D.) дәрежесін алу үшін

Александрова Алена Михайловнаның

диссертация тақырыбы: «Карлавирустарға тұрақты өсімдіктерді алу үшін РНҚ-интерференцияны басатын картоптың S-вирусы ақуыздарын анықтау».

Жұмыстың жалпы сипаттамасы. Зерттеу жұмысы картоптың S-вирусы (PVS) ақуыздарының потенциалды супрессорлық белсенділігін, оның Қазақстанның әртүрлі аймақтарында таралуын зерттеуге, PVS-тың қожайын-өсімдік жасушаларымен өзара әрекеттесуі мен картопты вирустық инфекциядан қорғау әдістерін әзірлеуге арналған.

Зерттеу тақырыбының өзектілігі. Картоп бүкіл әлемде өсірілетін ең танымал дақылдардың бірі, сонымен қатар ол әртүрлі қоздырғыштармен зақымдануға бейім, өйткені оның көбеюі вегетативті жолмен (түйнектермен) жүзеге асырылады. Картоп өсімдіктеріне 30-дан астам түрлі вирустар әсер етеді, олардың ішінде ең үлкен экономикалық залал келтіретіндері картоп жапырақтарының бұралу вирусы (КЖБВ, Potato Leaf Roll Virus, PLRV), X-, M-, S- және Y- картоп вирустары (PVX, PVM PVS және PVY). PVS және PVM бір *Carlaviruses* тұқымдасына жатады және жоғарыда аталғандардың ішінде ең аз зерттелген, бірақ қазіргі уақытта Қазақстан аумағында ең көп таралған түрі. Картоптың вирустық ауруларының экономикалық зияны күрделі вирустық инфекциялардың ауыр жағдайында 75% дейін өнім жоғалтуымен бағаланады. Вирусқа төзімді картоп сорттарын сауықтыру және алу әдістерінің әлі де жеткілікті түрде тиімді емес. Осы тұрғыдан алғанда, бұл салада гендік-инженерлік тәсілдерді қолдану картоп селекциясы бойынша одан әрі жұмыстардың бастапқы желілерін кұрудың алдағы жұмыстардың ең перспективті бағыты болып табылады.

РНҚ интерференциясы – бұл вирустық инфекциялармен күресетін функцияларының бірі болып табылатын жасуша транскриптомын реттеудің табиғи жасушалық механизмі. Бүгінгі таңда жасуша транскриптомының реттелуін зерттеу молекулалық биология ғылымдарының ең өзекті бағыттарының бірі болып табылады. Бұл процестің функциялары гендердің транскрипциясын, экспрессиясын және транскрипциядан кейінгі кідірісін реттеу ғана емес, сонымен қатар вирустармен ұсынылған эндогендік және бөгде РНҚ молекулаларынан қорғау болып табылады. Өсімдік вирустарының көпшілігінде генетикалық ақпараттың тасымалдаушысы ретінде РНҚ молекуласы болады, оның қабылдаушы жасушамен әрекеттесуі де оның транскрипциясы мен трансляциясы деңгейінде жүзеге асады. Вирустар, өз кезегінде, РНҚ интерференциясының жасушалық процесін супрессорлық ақуыздармен басу арқылы оған қарсы әрекет етеді. Вирустардың бір-бірімен және қожайын жасушалары арасындағы өзара әрекеттесуін зерттеу вирустық инфекциялармен күресудің тиімді әдістерін жасауға және ауыл шаруашылық

дақылдарының (картоптың) өнімділігін бірнеше есе арттыруға мүмкіндік береді.

Зерттеу нысаны картоптың S-вирусы (PVS), оның геномдық (г)РНК және ол кодтайтын ақуыздар болды. Сонымен қатар, Қазақстанда өсірілетін картоптың әртүрлі сорттары зерттелді.

Зерттеу пәні PVS вирусының ақуыздарының супрессорлық қасиеттерін бағалау және картопты карлавирус инфекциясынан қорғау үшін трансгенді өсімдіктерде РНК интерференциясы механизмін іске қосу мүмкіндігі болды.

Зерттеу әдістері. Жұмыстың нәтижелері заманауи молекулярлық-биологиялық әдістерді қолдану арқылы алынды: өсімдік ұлпасынан РНК және ДНК бөліп алу, кері транскрипция (КТ) және полимеразды тізбекті реакция (ПТР), иммундық ферментті талдау (ИФТ), солтүстік блоттинг, Сэнгер мен Illumina® бойынша секвенирлеу, агароздық және полиакриламидті геледегі электрофорез, клондау және ген экспрессиясы, сонымен қатар MEGA-X (v. 10.0.2), NCBI BLAST және GenBank көмегімен биоинформатикалық талдаудың заманауи әдістері және т.б.

Жұмытың мақсаты: Вирус жұқтырған өсімдік жасушаларында РНК интерференция процесін басуды тудыратын картоп вирусының S ақуыздарын (PVS) анықтау, генетикалық және жасушалық инженерия әдістерін қолдана отырып, PVS және басқа да фитопатогенді вирустарға генетикалық тұрғыда бекітілген тұрақтылығы бар картоп өсімдіктерін құру биотехнологиясын әзірлеу.

Зерттеу жұмысының мақсаты:

1. Қазақстан Республикасының Алматы және Қостанай облыстарында PVS кездесетінін анықтау. Осы аймақтарда кең таралған PVS изоляттарын анықтау үшін PVS вирусының қабығының ақуызын кодтайтын нуклеотидтер тізбегін секвенирлеу.
2. PVS вирусының бес ақуызының (25K, 7K, 12K, ақуыз қабығы (CP) және 11K) 16с сызығындағы *Nicotiana benthamiana* индикаторлық темекі өсімдіктерінде өтпелі экспрессия үшін pBIN19 векторының құрамына аминқышқылдарының тізбегін кодтайтын рекомбинантты ДНК жасап, оларды РНК интерференциясын басу қабілетіне талдау жүргізу.
3. pSAMBIA2300 бинарлы агробактериялық векторының негізінде картоп өсімдіктерінің тұрақты генетикалық трансформациясы үшін ақуыз қабығының және 25K PVS ақуыз тізбегін кодтайтын интрон-түйреуіш ДНК құрылымдарын жасау. Алынған трансгенді өсімдіктерде вирустардың болуын тексеріп, төзімді және сау өсімдік линияларын таңдап алу.

Зерттеудің ғылыми жаңалығы. Алғаш рет төмен деңгейде болған PVS ақуыздарындағы супрессорлық белсенділікті анықтау бойынша зерттеу жұмыстары жүргізілді. Зерттеулер нәтижесінде РНК интерференциясының табиғи механизмін ынталандыруға негізделген картопты сауықтырудың жаңа әдісі әзірленді және генетикалық төзімді картоп өсімдіктерін өндіруге бұл

тәсілдің тиімділігі туралы сенімді дәлелдер алынды. Картоптың үш трансгенді сызығында микро(ми)РНҚ секвенциясы және кейіннен вирамның қайта құрылуы арқылы вирустық инфекцияға төзімділікті тудыратын трансгенделдалдық қысқа интерференциялық (ки)РНҚ екендігі дәлелденді.

Жұмыстың теориялық маңыздылығы Қазақстан Республикасының аумағындағы PVS вирусының изоляттарының әртүрлілігін бағалауда және нашар зерттелген PVS вирусының қабылдаушы жасушамен әрекеттесуін зерттеуден тұрады. Жұмыс нәтижесінде NCBI GenBank дерекқорына қазақстандық PVS изоляттарының 3 тұтас геномдық тізбегі (MK442089, ON583978, MN095414) және PVY вирусының 2 тұтас геномдық тізбегі (ON583979, ON583980) депонирленді.

Интрон-түйреуіш рекомбинантты ДНҚ конструкцияларын қолдану негізінде вирустық инфекциялармен жұқтырылған картопты сауықтырудың жаңа әдісі әзірленді.

Жұмыстың практикалық маңызы. Жұмысты орындау барысында алынған нәтижелер белгілі бір вирустық инфекцияларға генетикалық тұрғыдан төзімді картоптың жаңа сорттары мен будандарын алудың биотехнологиясын әзірлеу үшін, сонымен қатар картопты сауықтыру құралдарының бірі ретінде пайдаланылуы мүмкін. Осы жолмен алынған өсімдіктерді отырғызу материалы ретінде пайдалану картопты вирустық инфекциялардың негізгі тасымалдаушысы бітеден қорғау үшін қымбат тұратын инсектицидтік препараттарды қолдануды азайтады, бұл картоп егінінің өнімділігінің артуына әкеледі.

Қазіргі уақытта әртүрлі инфекцияларға төзімділікті дамыту арқылы ауыл шаруашылығы дақылдарының өнімділігін арттырудың жаңа тәсілдерін енгізу оңтайлы бағыт болып табылады. Мұның бірнеше себептері бар - климаттың өзгеруі, ауыл шаруашылығының қарқындылығы, ауыл шаруашылығы дақылдарының жеке аудандастырылған сорттарын өсіру арқылы азық-түлік қауіпсіздігінің артуы, өсімдіктерді қорғау үшін қолданылатын химиялық құралдарына жәндіктердің төзімділіктің тұрақты дамуы және т.б. Жұмыста ұсынылған вирусқа төзімді өсімдіктерді алу әдісін ауыл шаруашылығында кеңінен қолдануға болады, өйткені генетикалық трансформация нәтижесінде протеин түріндегі трансгенді экспрессия өнімі жоқ, бұл дегеніміз генетикалық түрлендірілген организмдерді адамның тағамдық өнімі мен ауыл шаруашылығы дақылдарына жем ретінде пайдаланудың теріс салдары жоқ екенін болжайды.

Жұмысты қорғауға ұсынылған негізгі мәліметтер:

1. Қазақстанда ең кең таралған вирустық инфекциялар PVS (35%-дан астам) және PVM (80%-дан астам) – *Carlavirus* тұқымдасының өкілдері. PVS көбінесе PVM бар кешенді инфекцияда кездеседі. Қазақстан аумағында екі штаммға жататын PVS изоляттарының алуан түрі бар – Ordinary («Fortune», NCBI GenBank ак. № MK442089; «PVS_ ALYU-75» ON583978) және Andean (Үшқоңыр, MN095414).
2. Ақуыз қабығы (CP), 25K және 11K ақуыздары PVS^A (Andean) 16c сызығындағы *Nicotiana benthamiana* индикаторлық темекі

өсімдіктерінде өтпелі экспрессия жағдайында анықтау шегінде әлсіз супрессорлық белсенділікті көрсетеді. 2-ден 6-ға дейін синтезделген PVS⁰ (Ordinary) штаммының ақуыздарында ашық оқу шеңберлері (АОШ) бұл жүйеде айқын супрессорлық қасиеттерді тіркеу мүмкін болмады.

3. РНҚ интерференция индукторы ретінде интрон-түйреуіш ДНҚ құрылымдарын пайдалану трансгенді картопта туыстас вирустарға біршама төзімділіктің дамуына ықпал етті, сонымен қатар шағын РНҚ деңгейінде жұқтырған өсімдіктерге сауықтыру әсерін береді.

Жұмыстың негізгі нәтижелері мен қорытындылары. PVS^A вирусының бес OPS кодтау тізбегі (25K, 7K, 12K, CP және 11K) 16с сызығының *Nicotiana benthamiana* жүйесіндегі РНҚ интерференциясын индукциялау эксперименттерінде детекция шегінде әлсіз супрессорлық белсенділікті көрсетті. PVS⁰ штаммында ақуыздар соншалықты әлсіз супрессорлық белсенділікті көрсетті, оны *N. benthamiana* 16с жүйесінде анықтау мүмкін емес, ол үшін басқа тәсілді іздеу керек.

pSAMBIA2300 векторы негізінде рекомбинантты түйреуіш ДНҚ-құрылымдарының 4 нұсқасы алынды, ақуыз қабықшасының (CP) және 25к PVS ақуызының «movement» нуклеотидтік тізбегін тікелей және кері бағытта кодтайтын, 4 вирустық инфекциялардан және қазақстандық, шетелдік селекцияның 12 жұқтырған сорттарын тұрақты трансформациялау үшін пайдаланылды. Картоптың бір және күрделі вирустық инфекциялармен жұқтырған сорттарының негізінде 50 трансформатор желісі алынды. Желілердің бір бөлігі жылыжайда өсірудің 6 айынан кейін кешенді вирустық инфекциядан оқшау екенін көрсетті. Кейінгі 3 жылдық далалық сынақтар 20 трансгенді желінің тек PVS ғана емес, сонымен қатар PVM инфекциясына төзімділігін көрсетті. Картоптың трансгенді сызықтарының РНҚ молекулалық талдауы картоптың үш сызығында (№119, №61 және №103) трансгенделдалдық киРНҚ бар екенін көрсетті. Кейінгі миРНҚ секвенциясы бұл сызықтардың инфекцияға төзімділігі 25K PVS трансгенді кірістіру экспрессиясына байланысты екенін дәлелдеді.

Алынған нәтижелерге сүйене отырып, келесі **қорытындыларды** жасауға болады:

1. Қазақстан аумағында картопқа әсер ететін ең көп таралған вирустық инфекциялар карлавирустар тұқымдасының екі өкілі – PVS және PVM болып табылады.
2. Ақуыз қабығы (CP), 25K және 11K ақуыздары PVS^A (Andean) 16с сызығындағы *Nicotiana benthamiana* индикаторлық темекі өсімдіктерінде өтпелі экспрессия жағдайында анықтау шегінде әлсіз супрессорлық белсенділікті көрсетеді. 2-ден 6-ға дейін синтезделген PVS⁰ (Ordinary) штаммының ақуыздарында ашық оқу шеңберлері (АОШ) бұл жүйеде айқын супрессорлық қасиеттерді тіркеу мүмкін болмады.

3. Өсімдіктерді трансформациялау үшін интрон-түйреуіш рекомбинантты ДНҚ-ны қолдану вирустық инфекцияларға генетикалық тұрғыдан төзімді сызықтарды алуға ғана емес, сонымен қатар РНҚ интерференция механизмін іске қосу арқылы жұқтырған өсімдіктерді сауықтыруға қабілетті.

Диссертациялық жұмыстың ғылыми зерттеулермен байланысы. Диссертациялық жұмыстың ғылыми зерттеулері АР05131133 «Вирус пен өсімдіктің өзара әрекеттесуінің молекулярлық механизмдерін зерттеу және вирустық материалды жақсарту мақсатында қабылдаушы жасушалардың РНҚ интерференция процесін басатын картоп вирусының *S* ақуыздарын анықтау» және OR11465447 «Қазақстанның әртүрлі аймақтарындағы картоптың вирустық зақымдануының эпидемиологиялық жағдайын бағалау және жергілікті изоляттардың молекулалық-генетикалық ерекшеліктерін анықтау» ғылыми-зерттеу жобалары аясында жүзеге асырылды.

Апробация, автордың жеке үлесі мен жұмыс нәтижелерін мақұлдау және. Жұмыстың нәтижелері 27 басылымда жарияланды, оның ішінде 3 мақала рейтингі және дәйексөз индексі жоғары халықаралық рецензияланатын басылымдарда жарияланған. Атқарылған жұмыстардың қорытындысы бойынша Қазақстан Республикасының 3 патенті алынды. Жарияланған еңбектерде автордың жеке үлесі басты болды.

Диссертациялық жұмыстың құрылымы мен көлемі. Диссертация 136 бетте берілген, анықтамалардан, белгілеулерден және қысқартулардан, кіріспеден, әдебиеттерге шолудан, зерттеу материалдары мен әдістерінен, нәтижелер мен талқылаудан, қорытындыдан пайдаланылған әдебиеттер тізімінен тұрады.