

## АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание степени доктора философии (Ph.D.)  
по специальности «6D070100 – Биотехнология»

**Александровой Алёны Михайловны**

на тему: «Идентификация белков S-вируса картофеля, супрессирующих РНК-интерференцию, для получения растений, устойчивых к карлавирусам»

**Общая характеристика работы.** Работа посвящена изучению потенциальной супрессорной активности белков S-вируса картофеля (PVS), его распространению в различных областях Казахстана, взаимодействию PVS с клетками растения-хозяина и разработке способов защиты картофеля от заражения вирусами.

**Актуальность темы исследования.** Картофель является одной из самых популярных сельскохозяйственных культур, возделываемых по всему миру, а также одной из наиболее подверженных заражению различными патогенами, поскольку размножение его осуществляется вегетативным способом (клубнями). Растения картофеля поражаются более чем 30-ю различными вирусами, из которых наибольший экономический ущерб наносят вирус скручиваемости листьев картофеля (ВСЛК, Potato Leaf Roll Virus, PLRV), X-, M-, S- и Y-вирусы картофеля (Potato virus X, M, S и Y (PVX, PVM PVS и PVY)). PVS и PVM относятся к одному роду *Carlaviruses* и являются наименее изученными из упомянутых выше, однако самыми распространенными на территории Казахстана в настоящее время. Экономический ущерб вирусных заболеваний картофеля оценивается в потерях урожая до 75% в тяжелых случаях комплексных вирусных инфекций. Методы оздоровления и получения вирусостойчивых сортов картофеля все еще не обладают достаточной эффективностью. С этой точки зрения, использование генно-инженерных подходов в данной области является наиболее перспективным направлением по созданию исходных линий для дальнейшей работы по селекции картофеля.

РНК-интерференция представляет собой природный клеточный механизм регуляции транскриптома клетки, одной из функций которого является борьба с вирусными инфекциями. На сегодняшний день изучение регуляции транскриптома клетки является одним из наиболее актуальных направлений исследований молекулярной биологии. Функциями этого процесса является не только регуляция транскрипции, экспрессии и посттранскрипционного замалчивания генов, но также и защита от эндогенных и чужеродных молекул РНК, представителями которых являются вирусы. Большинство растительных вирусов содержат в качестве носителя генетической информации молекулу РНК, взаимодействие которой с клеткой хозяина так же осуществляется на уровне её транскрипции и трансляции. Вирусы, в свою очередь, противодействуют клеточному процессу РНК-интерференции, подавляя её белками супрессорами. Изучение взаимодействия вирусов между собой и клетками хозяина позволяет разработать эффективные способы борьбы с вирусными инфекциями и повысить урожайность сельскохозяйственных культур (картофеля) в несколько раз.

**Объектом исследования** служил S-вирус картофеля (PVS), его геномная (г)РНК и кодируемые ею белки. Кроме того, исследовались разные сорта картофеля, культивируемые в Казахстане.

**Предметом исследования** являлись оценка супрессорных свойств белков вируса PVS, и возможность запуска механизма РНК-интерференции у трансгенных растений, для защиты картофеля от заражения карлавирусами.

**Методы исследования.** Результаты работы были получены с использованием современных молекулярно-биологических методов: выделения РНК и ДНК из растительной ткани, реакции обратной транскрипции (РОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР), иммуноферментного анализа (ИФА), northern-блоттинга, секвенирования по Сэнгеру и Illumina<sup>®</sup>, электрофореза в агарозе и полиакриламидном геле, клонирования и экспрессии генов, а также современных методов биоинформатического анализа с использованием MEGA-X (v. 10.0.2), NCBI BLAST и GenBank и т.д.

**Цель работы:** Установить специфические белки S вируса картофеля (PVS), вызывающие супрессию процесса РНК-интерференции в зараженных клетках растения-хозяина и, используя методы геномной и клеточной инженерии, разработать биотехнологию создания растений картофеля с генетически закрепленной устойчивостью к PVS и другим фитопатогенным вирусам.

**Задачи исследования:**

1. Определить присутствие PVS в Алматинской и Костанайской областях Республики Казахстан. Провести секвенирование нуклеотидной последовательности, кодирующей белок оболочки вируса PVS для идентификации изолятов PVS, распространенных в этих регионах.
2. Создать рекомбинантные ДНК, кодирующие аминокислотные последовательности пяти белков вируса PVS (25К, 7К, 12К, белок оболочки (СР) и 11К) в состав вектора pBIN19 для транзientной экспрессии в индикаторных растениях табака *Nicotiana benthamiana* линии 16с и проанализировать их на способность к подавлению РНК-интерференции.
3. На основе бинарного агробактериального вектора pCAMBIA2300 создать интрон-шпилечные ДНК-конструкции, кодирующие последовательности белка оболочки и 25К белка PVS для стабильной генетической трансформации растений картофеля. Тестировать полученные трансгенные растения на присутствие вирусов и отобрать устойчивые и оздоровленные линии растений.

**Научная новизна исследования.** Впервые была проведена работа по идентификации супрессорной активности у белков PVS, которая оказалась на низком уровне. В результате исследований был разработан новый метод оздоровления картофеля на основе стимуляции естественного механизма РНК-интерференции и получены убедительные доказательства эффективности данного подхода к оздоровлению и получению генетически-устойчивых к вирусам растений картофеля. Посредством секвенирования микро(ми)РНК и последующей реконструкции вирусных последовательностей в трех трансгенных линиях картофеля было доказано, что именно трансген-опосредованные

короткие интерферирующие (ки)РНК вызывают резистентность к вирусному заражению.

**Теоретическая значимость работы** состоит в оценке разнообразия изолятов вируса PVS на территории Республики Казахстан и изучении взаимодействия слабо изученного вируса PVS с клеткой хозяином. В результате работы в базу данных NCBI GenBank было депонировано 3 полногеномные последовательности казахстанских изолятов PVS (MK442089, ON583978, MN095414) и 2 полногеномные последовательности вируса PVY (ON583979, ON583980).

На основе использования интрон-шпилечных рекомбинантных ДНК-конструкций был разработан новый метод оздоровления зараженного вирусными инфекциями картофеля.

**Практическая значимость работы.** Полученные в ходе выполнения работы результаты могут быть использованы для разработки биотехнологии получения новых сортов и гибридов картофеля с генетически закрепленной устойчивостью к определенным вирусным инфекциям, а также как один из инструментов оздоровления картофеля. Использование полученных таким способом растений, в качестве посадочного материала, позволит сократить использование дорогих инсектицидных препаратов для защиты картофеля от поражения тлей – основным переносчиком вирусных инфекций, что приведет к повышению урожайности и продуктивности картофеля.

В настоящее время внедрение новых подходов к повышению продуктивности агрокультур посредством развития устойчивости к различным инфекциям является перспективным направлением. Причин тому существует несколько – изменение климата, интенсификация сельского хозяйства, усиление продовольственной безопасности за счет выращивания собственных районированных сортов сельхоз культур, постоянное развитие резистентности у насекомых к применяемым средствам химической защиты растений и т.д. Предложенный в работе метод получения вирусоустойчивых растений может найти широкое применение в биотехнологии и сельском хозяйстве, поскольку, в результате генетической трансформации отсутствует продукт экспрессии трансгена в виде протеина, что позволяет предположить отсутствие негативных последствий использования таких генетически-модифицированных организмов в качестве продукта питания человека и корма для сельскохозяйственных животных.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Наиболее распространенными вирусными инфекциями в Казахстане являются PVS (более 35%) и PVM (более 80%) – представители рода *Carlavirus*. PVS чаще всего встречается в комплексной инфекции с PVM. На территории Казахстана существует широкое разнообразие изолятов PVS, относящиеся к двум штаммам – Ordinary («Fortune», NCBI GenBank acc. nos. MK442089; «PVS\_ALYU-75» ON583978) и Andean (Ushkonyr, MN095414).

2. Белок оболочки (CP), а также белки 25К и 11К вируса PVS<sup>A</sup> (Andean) проявляют слабую супрессорную активность на грани детекции в условиях транзientной экспрессии в индикаторных растениях табака *Nicotiana benthamiana* линии 16с. У белков штамма PVS<sup>O</sup> (Ordinary), синтезируемых с 2-ой по 6-ю открытые рамки считывания (ОРС) выраженных супрессорных свойств в этой системе зарегистрировать не удалось.
3. Использование интрон-шпилечных ДНК-конструкций в качестве индуктора РНК-интерференции способствовало развитию множественной устойчивости к родственным вирусам у трансгенного картофеля, а также обеспечивает оздоравливающий эффект на заражённых растениях на уровне малых РНК.

**Основные результаты работы и выводы.** Кодированные последовательности трех ОРС вируса PVS<sup>A</sup> (CP, 25К и 11К) проявили слабую супрессорную активность на грани детекции в экспериментах по индукции РНК-интерференции в системе *Nicotiana benthamiana* линии 16с. У штамма PVS<sup>O</sup> белки проявляли настолько слабую супрессорную активность, что детектировать её в системе *N. benthamiana* 16с не возможно, для этого нужно искать другой подход.

Получены 4 варианта рекомбинантных шпилечных ДНК-конструкций на основе вектора pCAMBIA2300, кодирующие нуклеотидные последовательности белка оболочки (CP) и «movement» протеина 25К PVS в прямой и обратной ориентациях, использованные для стабильной трансформации 4-х свободных от вирусных инфекций и 12-ти зараженных сортов казахстанской и зарубежной селекции. На основе зараженных одиночными и комплексными вирусными инфекциями сортов картофеля было получено 50 линий трансформантов. Часть линий показала освобождение от комплексной вирусной инфекции уже через 6 месяцев культивирования в теплице. Последующие 3-х летние полевые испытания продемонстрировали устойчивость 20-ти трансгенных линий к заражению не только PVS, но и PVM. Проведенный молекулярный анализ РНК трансгенных линий картофеля показал присутствие трансген-опосредованных кРНК у трех линий картофеля (№119, №61 и №103). Последующее секвенирование миРНК доказало, что устойчивость этих линий к заражению обусловлена экспрессией трансгенной вставки 25К PVS.

На основании полученных результатов можно сделать следующие **выводы:**

1. Наиболее распространенными вирусными инфекциями, поражающими картофель на территории Казахстана являются два представителя рода карлавирусов – PVS и PVM.
2. Белок оболочки (CP), 25К и 11К белки PVS<sup>A</sup> (Andean) проявляют слабую супрессорную активность на грани детекции в условиях транзientной экспрессии в индикаторных растениях табака *Nicotiana benthamiana* линии 16с. У белков штамма PVS<sup>O</sup> (Ordinary), синтезируемых с 2-й по 6-ю ОРС выраженных супрессорных свойств в этой системе не зарегистрировано.

3. Использование интрон-шпилечных рекомбинантных ДНК для трансформации растений ведет не только к получению генетически устойчивых к вирусным инфекциям линий, но и способно оздоравливать зараженные растения посредством запуска механизма РНК интерференции.

**Связь диссертационной работы с научными исследованиями.** Научные исследования диссертационной работы выполнены в рамках научно-исследовательских проектов AP05131133 «Выявление белков S вируса картофеля, подавляющих процесс РНК-интерференции клеток хозяина, с целью исследования молекулярных механизмов взаимодействия вируса и растения и оздоровления вирусного материала» и OR11465447 «Оценка эпидемиологической ситуации вирусных поражений картофеля в различных регионах Казахстана и выявление молекулярно-генетических особенностей местных изолятов».

**Апробация, одобрение результатов работы и личный вклад автора.**

Результаты работы опубликованы в 27 печатных работах, в том числе 3 статьи были опубликованы в международных рецензируемых журналах с высоким рейтингом и индексом цитирования. По результатам проделанной работы было получено 3 патента Республики Казахстан. Личный вклад автора был основным в опубликованных работах.

**Структура и объем диссертационной работы.** Диссертация изложена на 136 страницах, состоит из определений, обозначений и сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, списка использованных источников.