

## АННОТАЦИЯ

исследовательской работы на соискание степени  
доктора философии (PhD) по специальности «8D05105 - Биотехнология»  
**Пожарского Александр Сергеевич**

**на тему: «Изучение генофонда и редактирование генома сортов томата казахстанской селекции»**

### **Общая характеристика работы**

Работа посвящена исследованию локального генофонда сортов томата отечественной селекции с использованием молекулярно-генетических маркеров и редактированию генома отечественных сортов томата, отобранных путем молекулярного скрининга на маркеры устойчивости к патогенам, с целью достижения резистентности к мучнистой росе, вызываемой грибом *Oidium neolycopersici*.

### **Актуальность темы исследования**

Томат *Solanum lycopersicum* L. — один из важнейших представителей культурных растений семейства *Solanaceae*, в том числе в Казахстане. Производство томатов в стране развивается скорее экстенсивно, чем интенсивно: за последние 30 лет зарегистрировано увеличение площади выращивания в два раза, при отсутствии улучшения удельной урожайности на гектар посевной площади. По данным Комитета государственных доходов Министерства финансов Республики Казахстан, значительная доля местного рынка томатов приходится на импорт. Отечественные томатные хозяйства также полагаются на импорт семенного материала из-за рубежа. Импорт связан с риском занесения и передачи новых патогенных инфекций, что может привести к огромным потерям урожая, а при распространении с ними очень сложно справиться.

Среди сортов томата, допущенных к выращиванию в стране, преобладают зарубежные сорта со значительной долей сортов из России и других стран бывшего СССР. Такая зависимость от импортного посадочного материала создает различные риски для продовольственной безопасности, наиболее опасным из которых является возможный завоз опасных вредителей, сорняков и патогенов. Для борьбы с потенциально вредоносными фитопатогенами важно повышать потенциал устойчивости возделываемых культур к болезням путем селекции и отбора сортов с генетическими факторами устойчивости, а также генетической инженерии. Однако в Казахстане внедрение таких передовых методов селекции томата ограничено относительно невысокими экономическими и научными интересами. До настоящего времени не предпринималось систематических усилий по закладке молекулярно-генетической основы селекционных программ томатов.

Мучнистая роса — одно из самых распространенных заболеваний растений во всем мире, в том числе для томата. Ключевую роль в реакции растений на возбудителей мучнистой росы играют гены белков группы MLO, являющиеся фактором восприимчивости растения к болезни у всех групп наземных растений. Для томата описаны гены, кодирующие белки SIMLO1, SIMLO5 и SIMLO8 как связанные с восприимчивостью к мучнистой росе, вызываемой грибами *Oidium neolycopersici* и *Leveillula taurica*. Внесение в эти гены мутаций, нарушающих функцию белков, рассматривается как перспективный способ достижения устойчивости к мучнистой росе. Ранее технология CRISPR/cas9 была успешно использована для инактивации гена белка SIMLO1. Использование в настоящей работе одновременного редактирования генов белков SIMLO1, SIMLO5 и SIMLO8 проводится впервые, позволит добиться более сильной устойчивости и избежать преодоления устойчивости патогенами.

**Цель исследования** — молекулярно-генетический анализ сортов томата казахстанской селекции, отбор и редактирование генома перспективных сортов для получения растений, устойчивых к грибковым заболеваниям.

### **Задачи исследования:**

1. Изучить генетическое разнообразие сортов томата казахстанской селекции с использованием микросателлитных маркеров и известных маркеров устойчивости к грибковым и вирусным патогенам.
2. Провести CRISPR/Cas9 редактирование генов группы Mlo в отобранных сортах томата для получения растений, устойчивых к грибковым заболеваниям.
3. Провести филогенетический анализа генов группы Mlo в доступных геномах растений для оценки пределов применимости результатов работы к другим видам растений.

**Объект исследования:** Томат *Solanum lycopersicum* L. Мучнистая роса томата *Oidium neolycopersici* L. Kiss, 2001.

**Предмет исследования:** Резистентность растений томата к мучнистой росе и/или другим грибковым и бактериальным заболеваниям путем инактивации Mlo-подобных белков.

**Методы исследования:** выделение ДНК, РНК и белков, полимеразная цепная реакция, обратная транскрипция, гель-электрофорез, вестерн-блоттинг, секвенирование ДНК, Golden-Gate клонирование, трансформация бактерий — тепловой шок и электропорация, получение и культивирование каллусов растений, регенерация растений из каллусов, биоинформатический анализ.

### **Научная новизна исследования**

Проведено исследование генетической структуры сортов томата открытого грунта отечественной селекции с использованием SSR маркеров, а также скрининг с использованием маркеров устойчивости к опасным карантинным болезням томата. Впервые проведено редактирование генома методом CRISPR/Cas9 отечественных сортов томата с целью достижения устойчивости к мучнистой росе, вызываемой грибом *Oidium neolycopersici*. Присутствие данного патогена на территории Казахстана подтверждено с использованием морфологической и молекулярной идентификации. Впервые протестированы результаты одновременной инактивации генов *SIMlo1*, *SIMlo5*, *SIMlo8* и ее влияние на общую устойчивость томата к мучнистой росе.

### **Научная и практическая значимость**

Впервые охарактеризовано генетическое разнообразие сортов томата казахстанской селекции в сравнении с зарубежными сортами. Растения томата местных сортов впервые использованы как исходный объект для достижения устойчивости к инфекционным заболеваниям путем редактирования генома. Внесен вклад в установление гомологических связей между генами белков группы MLO среди доступных геномом покрытосеменных растений, а также предсказан возможный эффект геномного редактирования генов данной группы на достижение устойчивости в различных группах растений.

Геномное редактирование перспективных сортов томата позволит создать формы растений с высокой устойчивостью к мучнистой росе с возможностью последующего получения растений, свободных от трансгенных последовательностей. Работа заложит основу для дальнейших исследований в области редактирования генома растений в ИББР и других научно-исследовательских организациях Республики Казахстан.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Отечественные сорта томата открытого грунта обладают высокой степенью родства и близки к сортам российской селекции, с частотами совпадений SSR-генотипов 60-100% и оценкой сходства по алгоритму STRUCTURE до 90-95%. Не выявлено казахстанских сортов, несущих маркеры устойчивости к вирусным заболеваниям. Установлено семь казахстанских сортов, устойчивых к *F. oxysporum*, и два сорта – к *P. infestans*. Сорта Меруерт и Лидер выбраны как перспективные для проведения редактирования генома системой CRISPR/Cas9.
2. Мутации в генах *SIMlo5* и *SIMlo8* не приводят к увеличению резистентности по сравнению с одним геном *SIMlo1*, что подтверждается *P*-значениями *t*-теста Уэлча, значительно превышающими порог значимости 0,05, с учетом поправки на иножественные

сравнения. Секвенирование целевых участков редактирования генов *SIMlo* подтверждает наличие генетического мозаицизма: от 20 до 50% прочтений, покрывающих область делеции, демонстрирует отсутствие делеции. Приобретаемая устойчивость к мучнистой росе сохраняется при мозаицизме, что показано отсутствием значимого эффекта при сравнении линий с полным проявлении мутаций с мозаичными линиями тестом Уэлча при пороге значимости 0,05.

3. Выявлен высокий консерватизм последовательностей *SIMlo1*, *SIMlo5*, *SIMlo8* генов в кодирующих регионах (отсутствие вариантов в гене *SIMlo1*, 2 синонимичных варианта в гене *SIMlo5*, 2 синонимичных и 2 миссенс замены в гене *SIMlo8*), на основе имеющихся данных по геномной изменчивости 166 линий томата. В частности, была подтверждена инвариантность выбранных сайтов узнавания нРНК. Таким образом, разработанные нРНК могут использоваться на любых сортах и линиях томата с высоким шансом на специфичность редактирования благодаря 100% консервативности выбранных сайтов узнавания.

4. Разработанные нРНК также потенциально могут использоваться с другими видами семейства *Solanaceae*, однако точность такого спаривания требует дальнейшего уточнения с учетом доступных геномных данных соответствующих видов.

### **Основные результаты исследований**

1. Проведен молекулярно генетический анализ 68 сортов томата открытого грунта, в том числе 15 сортов казахстанской селекции с использованием 13 SSR маркеров для анализа генетической структуры выборки и 14 CAPS и SCAR маркеров устойчивости к 5 патогенам. Все местные сорта показали высокое генетическое сходство по использованным SSR-маркерам (от 60 до 100% совпадения SSR-генотипов между сортами). Из всех 11 полиморфных маркеров только три маркера продемонстрировали вариации генотипа внутри местных сортов: LEMDDNA с набором обнаруженных аллелей 211, 213, 227, 233; LELEUZIP с аллелями 102, 105, 106; и TMS58 с аллелями 226, 228, 230. Маркеры LELE25, LEATRACA $\beta$  и TM63 имели только два различающихся генотипа среди 15 местных сортов, а маркер LE20592 имел единственный различающийся генотип у сорта Сладкоежка. Сорта Янтарный, Лидер, Лучезарный, Меруерт, Восторг, Мечта образовали группу близких генотипов вместе с российскими сортами Новичок, Королек, Рассвет 365, 33 богатыря. Другие местные сорта были более разнообразными по сравнению с различными зарубежными сортами. Было выявлено, что отечественные сорта томата открытого грунта обладают высокой степенью родства и близки к сортам российской селекции, с частотами совпадений SSR-генотипов 60-100% и оценкой сходства по алгоритму STRUCTURE до 90-95%. Анализ маркеров устойчивости к патогенам выявил преобладающее наличие локусов устойчивости к грибу *Fusarium oxysporum* (маркеры At2 и Z1063, сцепленные с локусами *I* и *I2*, соответственно) и оомицету *Phytophthora infestans* (маркеры Ph3.gsm и TG328, сцепленные с локусом *Ph3*) по сравнению с вирусами. Наиболее часто встречающимся маркером был At2, связанный с локусом устойчивости *I* против *F. oxysporum*: половина из всех 64 успешно генотипированных образцов были положительными на устойчивость. Другой маркер устойчивости к *F. oxysporum*, Z1063, связанный с генами устойчивости *I2*, наблюдался у шести образцов, включая местный сорт Меруерт. Два кодоминантных маркера, Ph3-gsm и TG328, ассоциированы с локусом *Ph-3*, придающим устойчивость к *P. infestans*. Два местных сорта, Меруерт и Лидер, имеют устойчивый аллель Ph3-gsm. Маркеры, ассоциированные с резистентностью к вирусным инфекциям, среди отечественных сортов выявлено не было. Сорта Лидер и Меруерт, обладающие маркерами устойчивости к *Phytophthora infestans* и *Fusarium oxysporum* выбраны как перспективные для проведения редактирования генома системой CRISPR/Cas9.

2. Были разработаны направляющие РНК для внесения делеций в гены *SIMlo1*, *SIMlo5*, *SIMlo8* — 2 нРНК на ген, с сайтами узнавания на расстоянии ок. 50 п.н.. Методом агробактериальной трансформацией были получены 17 жизнеспособных растений томата сорта Лидер и 18 растений сорта Меруерт, для которых было подтверждено наличие вставки

Т-ДНК и подтверждена экспрессия нРНК и белка Cas9. Редактирование генома было подтверждено секвенированием в 9 растениях сорта Лидер и 11 растениях сорта Меруерт. Эти 20 растений были протестированы на устойчивость путем искусственного заражения *Oidium neolycopersici*. Эксперимент по инокуляции показал отсутствие преимущества при одновременном редактировании нескольких генов, так как эффект мутаций в генах *SIMlo5* и *SIMlo8* пренебрежимо мал в сравнении с геном *SIMlo1*, как показано *P*-значениями *t*-теста Уэлча, значительно превышающими порог значимости 0,05, с учетом поправки на множественные сравнения. Результатом редактирования генома, осуществляемого посредством агробактериальной трансформации, являются мозаичные растения. Таким образом, для получения линий томата, пригодных для применения в селекции, необходимо дальнейшее культивирование с целью получения чистых генотипов, свободных от мозаицизма, и исключения трансгенной вставки.

3. Анализ вариация генов *SIMlo* на основе публично доступных данных по геномной изменчивости 166 линий томата показал, что гены обладают высокой консервативностью в кодирующих регионах: выявлено отсутствие вариантов в гене *SIMlo1*, 2 синонимичных варианта в гене *SIMlo5*, 2 синонимичных и 2 миссенс замены в гене *SIMlo8*. Ген *SIMlo1* оказался одним из наиболее стабильных, с 16 вариациями в интронах и отсутствием вариантов в кодирующих областях. *SIM15* и *SIMlo8*, минорные факторы восприимчивости к мучнистой росе, имеют сравнительно высокую вариабельность интронов (62 и 44 вариантов в генах *SIM15* и *SIMlo8*, соответственно) при низкой изменчивости кодирующих областей. Был проведен филогенетический анализ 4886 последовательностей белков MLO широкого спектра видов растений. В результате были идентифицированы близкие гомологи белков SIMLO1, SIMLO5, SIMLO8 у видов родов *Solanum*, *Capsicum*, *Nicotiana* семейства *Solanaceae*. Однако, их вклад в устойчивость соответствующих видов к мучнистой росе остается неясным. Таким образом, разработанные направляющие РНК могут быть использованы для редактирования генов *SIMlo1*, *SIMlo5*, *SIMlo8* любых сортов и линий томата, так как целевые участки генов отличаются высокой консервативностью. Возможность применения разработанных направляющих РНК на других видах растений семейства пасленовых требует дальнейшего уточнения с использованием новых геномных и генетических данных.

#### **Выводы:**

1. Казахстанские сорта томата обладают высокой степенью родства друг с другом и близки к российским сортам (от 60 до 100% совпадения SSR-генотипов между сортами).
2. Среди казахстанских сортов маркеров устойчивости к вирусным патогенам не обнаружено. 8 казахстанских сортов обладали устойчивым генотипом маркера At2, сорт “Меруерт” обладал также устойчивым генотипом маркера Z103 (*F. oxysporum*) 2 казахстанских сорта, “Меруерт” и “Лидер”, обладали устойчивым генотипом маркера Ph3 (*P. infestans*)
3. Сорта “Меруерт” и “Лидер”, несущие маркеры устойчивости к *F. oxysporum* и *P. Infestans*, отобраны как кандидаты для редактирования генома.
4. Успешно проведена сборка, клонирование и трансформация растений векторными конструкциями для редактирования генов *SIMlo1*, *SIM15*, *SIMlo8*. Получены в общей сложности 35 растений сортов Лидер и Меруерт, из которых 18 были подтвержденными носителями мутаций в генах *SIMlo*. Подтверждена экспрессия нРНК и белка Cas9 в растениях методами ОТ-ПЦР и вестерн-блоттинга, соответственно
5. Секвенирование целевых участков генов подтвердило наличие делеций, однако показало частичный характер мутаций вследствие гетерозиготности и возможного мозаицизма: в среднем 50-70% прочтений на линии демонстрировали наличие делеции. Только две линии растений сорта “Меруерт”, несущие мутации MLO1 и MLO1+MLO8, были признаны чистыми мутантными линиями (98,89% и 97,96% мутантных прочтений, соответственно).
6. Инокуляция растений возбудителем мучнистой росы подтвердило положительный эффект мутации в гене *SIMlo1* на устойчивость к болезни (значительное снижение

среднего количества пораженных участков и их диаметра в сравнении с контрольными растениями, подтвержденное *t*-тестом Уэлча при пороге значимости 0,001 с учетом поправки на множественные сравнения), однако не выявило эффекта для генов *SlMlo5*, *SlMlo8*.

7. Участки генов *SlMlo1*, *5*, *8*, выбранные для редактирования, обладают высокой консервативностью (привести цифры) среди широкого круга геномов томата и таким образом разработанные нРНК могут быть использованы для различных сортов томата

8. Анализ последовательностей белков и генов MLO среди наземных растений позволил определить ближайших гомологов соответствующих генов среди растений семейства *Solanaceae*, включая 12 гомологов MLO1 у родов *Solanum*, *Capsicum*, *Nicotiana*; 3 гомолога MLO5 у рода *Solanum*; 7 гомологов MLO8 у родов *Solanum*, *Capsicum*, *Nicotiana*; однако дальнейшие выводы о применимости нРНК и участие генов в устойчивости к мучнистой росе ограничено доступными данными и требует дальнейшего рассмотрения.

#### **Личный вклад автора**

Автор непосредственно участвовал на всех этапах исследования: формирование цели и задач, разработка проекта, сбор биоматериала, проведение экспериментальных работ, интерпретация полученных результатов, формулирование выводов, подготовка результатов к публикации.

#### **Связь с планом основных научных работ**

Работа выполнялась в рамках программы целевого финансирования КН МОН РК BR18574149 «Создание высокопродуктивных сортов и линий сельскохозяйственных культур на основе инновационных биотехнологий» (руководитель Е. К. Туруспеков), а также программы целевого финансирования КН МОН РК BR21882269 «Использование технологии редактирования генома для повышения продуктивности экономически важных культурных растений» (руководитель Д. А. Гриценко).

#### **Апробация работы**

Результаты работы были представлены на следующих конференциях:

6-я Международная научная конференция «Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений» (PlantGen2021), 14-18 июня 2021, г Новосибирск, Россия.

IV. International Agricultural, Biological & Life Science Conference Agbiol 2022 29-31 August, 2022 Edirne, Turkey.

Международный форум «Современные тенденции устойчивого развития биологических наук», посвященный 90-летию КазНУ им. Аль-Фараби, 2024, 27-28 марта, Алматы, Казахстан.

Результаты диссертационной работы включены в ежегодные отчеты о НИР по проекту ПЦФ BR18574149 (2023–2024 гг.).

#### **Публикации**

По теме исследования опубликовано 10 научных работ, в том числе: 3 статьи в научных изданиях, входящих в 1-2 квартили по импакт-фактору в базе Web of Science; 1 статья в отечественном журнале, рекомендованном Комитетом по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования, 4 тезиса международных конференций, 1 методическое пособие и 1 патент на полезную модель.