

**Пожарский Александр Сергеевичтің
«8D05105 – Биотехнология» білім беру бағдарламасы бойынша философия докторы
(Ph.D.) ғылыми дәрежесін алу үшін «Қазақстандық қызанақ сорттарының
генофондын зерттеу және геномды редакциялау» тақырыбында дайындалған
диссертациясының
АҚДАТПАСЫ**

Жұмыстың жалпы сипаттамасы

Жұмыс *Oidium neolyopersici* саңырауқұлағы тудыратын ақұнтақты кеселіне төзімділікке қол жеткізу үшін патогенге төзімділік маркерлеріне молекулалық скрининг арқылы таңдалған отандық қызанақ сорттарының геномдық редакциясына арналған.

Зерттеу тақырыбының өзектілігі

Қызанақ *Solanum lycopersicum* L. — *Solanaceae* тұқымдасының мәдени өсімдіктерінің ең маңызды өкілдерінің бірі. Біріккен Ұлттар Ұйымының Азық-түлік және ауыл шаруашылығы ұйымының (FAO) деректеріне сәйкес, қызанақ Қазақстандағы жалпы көкөніс өндірісінің маңызды бөлігін құрайды: 2022 жылы 30,2 мың гектардан 788 760 тонна жиналды. Алайда, елдегі қызанақ өндірісі интенсивті дамудан гөрі экстенсивті түрде дамуда: соңғы 30 жылда өсіру алаңы екі есеге артқанымен, бір гектардан алынатын өнімділік көрсеткіші артпаған. Қазақстан Республикасы Қаржы министрлігінің Мемлекеттік кірістер комитетінің мәліметтері бойынша, жергілікті қызанақ нарығының едәуір бөлігі импортқа тәуелді. 2020 жылы 58 636 тонна қызанақ импортталған, негізінен Орталық Азия елдерінен, бұл жергілікті өндіріс көлемінің шамамен 7,4%-ына тең. Сондай-ақ, отандық қызанақ шаруашылықтары шетелден әкелінетін тұқымдық материалдарға тәуелді (2020 жылы 57,3 тонна көкөніс тұқымы импортталған, бірақ нақты дақыл есепке алынбаған). Импорт жаңа патогендік инфекциялардың таралу және тасымалдану қаупін тудырады. Әртүрлі қоздырғыштар (бактериялар, саңырауқұлақтар, вирустар және омицеттер) егіннің үлкен шығынына әкелуі мүмкін және олар тарағаннан кейін оларды бақылау өте қиын.

Елде өсіруге рұқсат етілген қызанақ сорттарының арасында Ресей мен бұрынғы КСРО елдерінің сорттары басым. Импорттық отырғызу материалына мұндай тәуелділік азық-түлік қауіпсіздігіне әртүрлі қауіп төндіреді, олардың ішіндегі ең қауіптісі қауіпті зиянкестер, арамшөптер мен патогендерді әкелу болып табылады. Сондықтан, ішкі нарық үшін өсімдіктердің эпидемиологиялық кешенді бақылауының бір бөлігі ретінде жергілікті селекцияның ескі және жаңадан алынған сорттарын кеңінен пайдалану маңызды. Қауіпті фитопатогендерге қарсы күресу үшін жұқтырылған өсімдіктерді уақтылы анықтап, жою ғана емес, сонымен қатар өсірілетін дақылдардың ауруларға төзімділігін селекция арқылы арттыру қажет. Өсімдіктердің ауруларға төзімділігімен байланысты молекулалық маркерлер қазіргі заманғы селекциялық бағдарламаларда маңызды рөл атқарады, өйткені маркерлік селекция (MAS) арқылы жаңа төзімді сорттарды шығаруға кететін уақыт пен еңбекті айтарлықтай қысқартуға мүмкіндік береді. Алайда, Қазақстанда қызанақ селекциясында осындай заманауи әдістерді енгізу экономикалық және ғылыми қызығушылықтардың салыстырмалы түрде төмен болуына байланысты шектеулі. Қызанақ селекциясы бағдарламаларының молекулалық-генетикалық негізін жасау бойынша жүйелі жұмыс әлі жүргізілмеген.

Ақұнтақ кеселі — бүкіл әлемде өсімдіктердің ең кең таралған ауруларының бірі. *Erysiphaceae* тұқымдасына жататын 800-ден астам саңырауқұлақ түрлері 10 000-ға жуық өсімдік түрін зақымдап, экономикалық маңызы бар ауыл шаруашылығы дақылдарына қауіп төндіреді. Өсімдіктердің ақұнтақ кеселі қоздырғыштарына реакциясында *MLO* тобының ақуыз гендері шешуші рөл атқарады, бұл жердегі өсімдіктердің барлық топтарында өсімдіктің ауруға бейімділік факторы. Қызанақ үшін *SIMLO1*, *SIMLO5* және *SIMLO8* ақуыздарын кодтайтын гендер *Oidium neolyopersici* және *Leveillula taurica* саңырауқұлақтарынан туындаған ақұнтақ ауруына сезімталдықпен байланысты деп

сипатталған. Бұл гендерге белоктардың қызметін бұзатын мутацияларды енгізу ақұнтақ кеселіне төзімділікке қол жеткізудің перспективалық жолы ретінде қарастырылады. Бұған дейін CRISPR/Cas9 технологиясы *SIMLO1* акуыз генін инактивациялау үшін сәтті қолданылған. Осы зерттеуде алғаш рет *SIMLO1*, *SIMLO5* және *SIMLO8* гендерін бір уақытта редакциялау жүзеге асырылды, бұл тұрақтылықты күшейтіп, патогендердің төзімділікті жеңу қаупін болдырмауға мүмкіндік береді.

Зерттеу мақсаты – Қазақстандық селекциядағы қызанақ сорттарына молекулалық-генетикалық талдау жүргізу, перспективалы сорттарды іріктеп, олардың геномын өңдеу арқылы саңырауқұлақ ауруларына төзімді өсімдіктер алу.

Зерттеу міндеттері:

1. Микросателлиттік маркерлерді және саңырауқұлақтар мен вирустық патогендерге төзімділіктің белгілі маркерлерін пайдалана отырып, қазақстандық селекциялық қызанақ сорттарының генетикалық әртүрлілігін зерделеу.

2. Саңырауқұлақ ауруларына төзімді өсімдіктерді алу үшін таңдалған қызанақ сорттарында *MLO* тобының гендерін CRISPR/Cas9 технологиясымен өңдеу.

3. *Mlo* топтық гендерінің филогенетикалық талдауын өсімдіктердің қолжетімді геномдарында жүргізу және жұмыс нәтижелерінің басқа өсімдіктер түрлеріне қолданылу шекараларын бағалау.

Зерттеу нысаны: *Solanum lycopersicum* L. қызанағы, *Oidium neolycopersici* L. Kiss (2001) тудыратын қызанақ ақұнтақ кеселі.

Зерттеу пәні: *Mlo* тәрізді акуыздарды инактивациялау арқылы қызанақ өсімдіктерінің ақұнтақ кеселіне және/немесе басқа саңырауқұлақ және бактериялық ауруларға төзімділігі.

Зерттеу әдістері: ДНҚ, РНҚ және акуыздарды оқшаулау, полимеразды тізбекті реакция, кері транскрипция, гель-электрофорез, вестерн-блоттинг, ДНҚ секвенирлеу, Golden-Gate клондау, бактерияларды трансформациялау (температуралық шок және электропорация), өсімдік каллусын алу және өсіру, каллустардан өсімдіктерді регенерациялау, биоинформатикалық талдау.

Ғылыми жаңалығы

Алғаш рет SSR маркерлерін пайдалана отырып, отандық селекцияның қызанақ сорттарының генетикалық құрылымын зерттеу, сондай-ақ қызанақтың қауіпті карантиндік ауруларына төзімділік маркерлерін пайдалана отырып скрининг жүргізілді. CRISPR/Cas9 әдісімен қазақстандық қызанақ сорттарының геномын редакциялау арқылы *Oidium neolycopersici* саңырауқұлағы тудыратын ақұнтақ кеселіне төзімділікке қол жеткізілді. Қазақстан аумағында аталған патогеннің бар екендігі морфологиялық және молекулалық идентификация әдістерімен алғаш рет расталды. *SIMlo1*, *SIMlo5* және *SIMlo8* гендерін бір уақытта инактивациялау нәтижелері алғаш рет тексеріліп, оның қызанақтың ақұнтақ кеселіне жалпы төзімділігіне әсері зерттелді.

Теориялық және практикалық маңызы

Қазақстандық селекциядағы қызанақ сорттарының генетикалық әртүрлілігі шетелдік сорттармен салыстырмалы түрде алғаш рет сипатталды. Жергілікті қызанақ сорттары геномды өңдеу арқылы инфекциялық ауруларға төзімділікті арттыру үшін бастапқы объект ретінде алғаш рет пайдаланылды. Гүлді өсімдіктердің қолжетімді геномдарындағы *MLO* топтық акуыз гендерінің гомологиялық байланыстары анықталды және осы топ гендерін геномдық өңдеудің түрлі өсімдіктер топтарында төзімділікке қол жеткізуге ықтимал әсері болжанды.

Қызанақтың перспективалы сорттарын геномдық өңдеу ақұнтақ кеселіне төзімділігі жоғары өсімдік формаларын жасауға мүмкіндік береді. Бұл зерттеулер нәтижесінде трансгендік тізбектерден таза өсімдіктер алуға болады. Жұмыс ӨББИ және Қазақстан Республикасының басқа да ғылыми-зерттеу ұйымдарында өсімдіктер геномын өңдеу саласындағы болашақ зерттеулерге негіз болады.

Қорғауға ұсынылатын негізгі қағидалар:

1. Ашық топырақта өсірілетін отандық қызанақ сорттары өзара тығыз байланысқа ие және ресейлік селекция сорттарына жақын, SSR-генотиптерінің сәйкестік жиілігі 60-100% және STRUCTURE алгоритмі бойынша ұқсастық бағасы 90-95%-ға дейін жетеді. Вирустық ауруларға төзімділік маркерлері бар қазақ сорттары анықталмады. *Fusarium oxysporum*-ға төзімді жеті қазақ сорты және *Phytophthora infestans*-қа төзімді екі сорт анықталды. Меруерт және Leader сорттары CRISPR/Cas9 жүйесі арқылы геномды редакциялау үшін перспективалы деп таңдалды.

2. *SIMlo5* және *SIMlo8* гендеріндегі мутациялар жалғыз *SIMlo1* геніне қарағанда төзімділіктің артуына әкелмейді, бұл шетелдік салыстыруларға түзетулер енгізу арқылы 0.05 маңыздылық шегінен айтарлықтай асып түсетін Уэлч t-тестінің Р-мәндерімен расталады. Нысаналы *SIMlo* генін редакциялау аймақтарын секвенирлеу генетикалық мозаицизмнің болуын растайды: делеция аймағын қамтитын оқылымдардың 20-50%-ы делецияның жоқтығын көрсетеді. Мозаицизм жағдайында ұнтақты зеңге қарсы алынған төзімділік сақталады, бұл мутациялардың толық көрінісі бар сызықтарды мозаикалық сызықтармен 0.05 маңыздылық шегінде Уэлч тесті арқылы салыстырғанда маңызды әсердің болмауымен расталады.

3. 166 қызанақ сызығының геномдық өзгергіштігі туралы қолжетімді деректер негізінде *SIMlo1*, *SIMlo5* және *SIMlo8* гендерінің кодтау аймақтарында жоғары консервацияланған тізбектері анықталды (*SIMlo1* генінде варианттар жоқ, *SIMlo5* генінде 2 синонимді вариант, *SIMlo8* генінде 2 синонимді және 2 миссенс алмастырулар бар). Атап айтқанда, таңдалған бағыттаушы РНҚ тану аймақтарының өзгеріссіздігі расталды. Осылайша, әзірленген бағыттаушы РНҚ-ларды кез келген сорттар мен қызанақ сызықтарында 100% консервативті тану аймақтарының арқасында редакциялау нақтылығының жоғары мүмкіндігімен қолдануға болады.

4. Әзірленген бағыттаушы РНҚ-ларды *Solanaceae* тұқымдасының басқа түрлерімен де қолдануға болады, бірақ мұндай сәйкестіктің дәлдігі осы түрлердің қолжетімді геномдық деректерін ескере отырып, қосымша зерттеуді қажет етеді.

Негізгі ғылыми жұмыстың жоспармен байланысы

1. Ашық топырақта өсірілетін 68 қызанақ сортының, соның ішінде қазақстандық селекцияның 15 сортының генетикалық құрылымы 13 SSR маркерін, ал 5 патогенге төзімділікті талдау үшін 14 CAPS және SCAR маркерін қолдана отырып, молекулалық-генетикалық талдау жүргізілді. Барлық отандық сорттар SSR-маркерлер бойынша жоғары генетикалық ұқсастық көрсетті. 11 полиморфты маркердің ішінде тек үш маркер жергілікті сорттардың генотиптерінің вариацияларын көрсетті: LEMDDNA маркері 211, 213, 227, 233 аллельдерімен; LELEUZIP маркері 102, 105, 106 аллельдерімен; TMS58 маркері 226, 228, 230 аллельдерімен ерекшеленді. LELE25, LEATRACAb және TM63 маркерлері 15 жергілікті сорттардың арасында тек екі түрлі генотипті көрсетті, ал LE20592 маркері тек «Сладкоежка» сортында ерекше генотип көрсетті. Бұл сорт барлық жергілікті сорттардың ішіндегі ең ерекшесі болды. «Янтарный», «Лидер», «Лучезарный», «Меруерт», «Восторг», «Мечта» сорттары ресейлік «Новичок», «Королек», «Рассвет 365», «33 богатыря» сорттарымен бірге жақын генотиптер тобын құрды. LEPRP4 және TMS58 маркерлері осы топта генотиптердің ең жиі болмауымен сипатталды. Басқа жергілікті сорттар әртүрлі шетелдік сорттармен салыстырғанда алуан түрлілік көрсетті.

Генетикалық талдау отандық қызанақ сорттарының ресейлік селекция сорттарына жақын және жоғары туыстыққа ие екенін анықтады. Патогендерге төзімділік маркерлерін талдау *Fusarium oxysporum* және *Phytophthora infestans* патогендеріне төзімділік локустарының вирустарға қарағанда басым екенін көрсетті. *F. oxysporum*-ға төзімділікпен байланысты At2 маркері ең жиі кездесетін маркер болды: генотиптелген 64 үлгінің жартысы төзімділікке оң нәтиже көрсетті. I2 генімен байланысты Z1063 маркері алты үлгіде, соның ішінде «Меруерт» сортында байқалды. Ph3-gsm және TG328 кодоминантты маркерлері *P. infestans*-қа төзімділікті қамтамасыз ететін Ph-3 локусымен байланысты болды. «Меруерт» және «Лидер» сорттары Ph3-gsm төзімді аллеліне ие болды. Вирустық

инфекцияларға төзімділікпен байланысты маркерлер отандық сорттарда анықталған жоқ. *P. infestans* және *F. oxysporum*-ға төзімділік маркерлеріне ие «Лидер» және «Меруерт» сорттары CRISPR/Cas9 жүйесі арқылы геномды өңдеу үшін перспективалы деп тандалды.

2. *SIMlo1*, *SIMlo5*, *SIMlo8* гендерінде делеция енгізу үшін бағыттаушы РНҚ әзірленді. Әзірленген нРНҚ GoldenGates әдісімен pCBC-DT1T2 плазмидасына CRISPR/Cas9 өңдеу кассетасының құрамында клондалып, кейін pKSE401 бинарлық векторына көшірілді. Агробактериялық трансформация әдісімен «Лидер» сортының 17 және «Меруерт» сортының 18 өміршең өсімдігі алынды, олардың Т-ДНҚ енгізілуі және нРНҚ мен Cas9 ақуызының экспрессиясы расталды. Геномды өңдеу «Лидер» сортының 9 және «Меруерт» сортының 11 өсімдігінде секвенирлеу арқылы расталды. Бұл 20 өсімдік *Oidium neolycopersici* инфекциясымен жасанды инфекциялау арқылы төзімділікке сыналды. Инокуляция нәтижесі бірнеше генді бір уақытта өңдеу артықшылық бермейтінін көрсетті, себебі *SIMlo5* және *SIMlo8* гендеріндегі мутациялардың әсері *SIMlo1* геніне қарағанда шамалы болды. Геномды өңдеу нәтижесінде мозаикалық өсімдіктер алынды және CRISPR/Cas9 жүйесінің трансгенді енгізілімдері сақталды. Селекцияда қолдануға жарамды қызанақ желілерін алу үшін мозаицизмнен таза генотиптерді алу және трансгенді енгізілімдерді жою мақсатында өсімдіктерді одан әрі өсіру қажет.

3. *SIMlo* гендерінің вариациясын талдау 166 қызанақ желісінің геномдық өзгергіштігі бойынша қолжетімді мәліметтерге негізделді. Бұл гендер жоғары консервативтілік танытты. *SIMlo1* гені интрондарда 16 вариациямен және кодтайтын аймақтарда вариациялардың болмауымен ең тұрақты гендердің бірі болды. *SIMlo5* және *SIMlo8* гендері интрондардың салыстырмалы жоғары өзгергіштігімен және кодтау аймақтарының төмен өзгергіштігімен ерекшеленді. 4886 өсімдік түрінің MLO ақуыздарының тізбегіне филогенетикалық талдау жүргізіліп, *Solanum*, *Capsicum*, *Nicotiana* туыстастарының *SIMLO1*, *SIMLO5*, *SIMLO8* ақуыздарының жақын гомологтары анықталды. Алайда, олардың сәйкес түрлердің ақұнтақ кеселіне төзімділігіне қосқан үлесі белгісіз болып қалды. Осылайша, әзірленген бағыттаушы РНҚ *SIMlo1*, *SIMlo5*, *SIMlo8* гендерін кез келген қызанақ сорттары мен желілерінде өңдеу үшін қолданылуы мүмкін, өйткені гендердің мақсатты аймақтары жоғары консервативті. Алқа тұқымдасының басқа өсімдік түрлерінде осы бағыттаушы РНҚ-ны қолдану мүмкіндігін жаңа геномдық және генетикалық деректерді пайдалана отырып нақтылау қажет.

Қорытындылар

1. Қазақстандық қызанақ сорттары бір-бірімен тығыз байланысты және ресейлік сорттарға жақын (сорттар арасындағы SSR-генотиптерінің сәйкестігі 60-100%).

2. Қазақстандық сорттарының арасында вирустық патогендерге төзімділік маркерлері анықталмады. 8 қазақ сорты төзімді генотип маркері At2-ге ие болды, ал «Меруерт» сорты қосымша *F. oxysporum*-ға төзімді генотип маркері Z103-ті иеленді. «Меруерт» және «Лидер» атты 2 қазақ сорты *P. infestans*-қа төзімді генотип маркері Ph3-ке ие болды.

3. *F. oxysporum* және *P. infestans*-қа төзімділік маркерлерін тасымалдаушы «Меруерт» және «Лидер» сорттары геномды редакциялау үшін кандидаттар ретінде тандалды.

4. *SIMlo1*, *SIMlo5*, *SIMlo8* гендерін редакциялау үшін векторлық конструкциялар арқылы өсімдіктер сәтті жиналды, клонданды және трансформацияланды. «Лидер» және «Меруерт» сорттарының жалпы 35 өсімдігі алынды, оның ішінде 18 *SIMlo* гендерінде мутация тасымалдаушылар ретінде расталды. Өсімдіктерде бағыттаушы РНҚ және Cas9 ақуызының экспрессиясы сәйкесінше RT-PCR және вестерн-блот әдістерімен расталды.

5. Нысаналы ген аймақтарын секвенирлеу делециялардың бар екенін растады, бірақ мутациялардың жартылай сипатын көрсетті, бұл гетерозиготалық пен ықтимал мозаицизмге байланысты: бір сызықтағы оқылымдардың орта есеппен 50-70%-ы делецияның болуын көрсетті. Тек «Меруерт» өсімдігінің екі сызығы таза мутанттық

сызықтар ретінде танылды (мутацияланған оқылымдардың сәйкесінше 98.89% және 97.96%-ы MLO1 және MLO1+MLO8 мутацияларымен).

6. Өсімдіктерді ұнтақты зең патогенімен жұқтыру тәжірибесі SIMlo1 геніндегі мутацияның ауруға төзімділікке оң әсерін растады (бақылау өсімдіктерімен салыстырғанда зақымданған аймақтардың орташа саны мен диаметрінің айтарлықтай төмендеуі, бұл көптік салыстыруға түзетумен 0.001 маңыздылық шегінде Уэлч t-тестімен расталды), бірақ *SIMlo5* және *SIMlo8* гендеріне әсері байқалмады.

7. Редакциялау үшін таңдалған *SIMlo1*, *SIMlo5*, *SIMlo8* ген аймақтары кең ауқымды қызанақ геномдарында жоғары консервацияланған (суреттерді келтіріңіз), сондықтан әзірленген gRNA-ларды әртүрлі қызанақ сорттарында қолдануға болады.

8. Құрлық өсімдіктері арасында MLO акуыздары мен гендерінің тізбектерін талдау Solanaceae тұқымдасына жататын өсімдіктер арасынан сәйкес гендердің ең жақын гомологтарын анықтады, олардың ішінде *Solanum*, *Capsicum*, *Nicotiana* туыстарында 12 MLO1 гомологы; *Solanum* туысында 3 MLO5 гомологы; *Solanum*, *Capsicum*, *Nicotiana* туыстарында 7 MLO8 гомологы табылды. Алайда, бағыттаушы РНҚ-ларды қолдану мүмкіндігі мен бұл гендердің ұнтақты зеңге төзімділікке қатысы туралы қорытындылар қолжетімді деректермен шектелген және қосымша зерттеулерді қажет етеді.

Автордың жұмыстағы жеке үлесі

Автор зерттеудің барлық кезеңдеріне тікелей қатысты: мақсаттар мен міндеттерді қалыптастыру, жобаны әзірлеу, биоматериалды жинау, тәжірбиелік жұмыстарды жүргізу, алынған нәтижелерді интерпретациялау, қорытындыларды тұжырымдау, нәтижелерді жариялауға дайындау.

Негізгі ғылыми жұмыстар жоспарымен байланысы

Жұмыс ПЦФ BR18574149 бағдарламасының «Инновациялық биотехнологиялар негізінде ауыл шаруашылығы дақылдарының жоғары өнімді сорттары мен желілерін жасау» тақырыбындағы «Биотикалық және абиотикалық стресске төзімді перспективалы қызанақ сорттарын геномдық редакциялау арқылы жоғары өнімді желілерді алу» міндеті аясында орындалды.

Жұмыстың апробациясы

Зерттеу жұмысының нәтижелері келесі конференцияларда ұсынылды:

6-шы Халықаралық ғылыми конференция «Өсімдіктер генетикасы, геномикасы, биоинформатикасы және биотехнологиясы» (PlantGen2021), 14-18 маусым 2021 ж., Новосибирск қ., Ресей.

IV Халықаралық ауыл шаруашылығы, биология және өмір туралы ғылымдар конференциясы Agbiol 2022, 29-31 тамыз 2022 ж., Эдирне қ., Түркия.

Әл-Фараби атындағы ҚазҰУ-дың 90 жылдығына арналған халықаралық форум «Биологиялық ғылымдардың тұрақты дамуының заманауи үрдістері», 27-28 наурыз 2024 ж., Алматы қ., Қазақстан.

Диссертациялық жұмыстың нәтижелері ПЦФ BR18574149 жобасы бойынша жылдық ғылыми-зерттеу есептеріне енгізілді (2023–2024 жж.).

Жарияланымдар

Зерттеу тақырыбы бойынша 10 ғылыми жұмыс жарияланды, оның ішінде: 3 мақала Web of Science деректер базасында 1-2 квартильді импакт-факторы бар ғылыми басылымдарда; 1 мақала ғылым және жоғары білім саласындағы сапаны қамтамасыз ету комитеті ұсынған отандық журналда; 4 халықаралық конференция тезисі; 1 әдістемелік нұсқаулық және 1 пайдалы модельге патент.