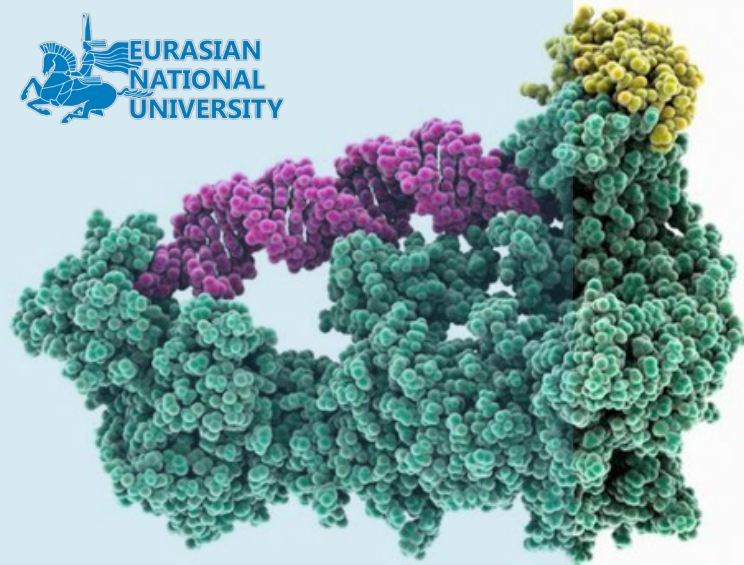


ҒЫЛЫМ ЖӘНЕ ЖОҒАРЫ БІЛІМ МИНИСТРЛІГІ
МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ



Л. Н. ГУМИЛЕВА АТЫНДАҒЫ
ЕУРАЗИЯ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ

ЕВРАЗИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
Л. Н. ГУМИЛЕВА

АСТАНА, ҚАЗАҚСТАН
11 СӘУІР 2024 ЖЫЛ

АСТАНА, КАЗАХСТАН
11 АПРЕЛЯ 2024 ГОД

"ОМАРОВ ОҚУЛАРЫ: ХХІ
ҒАСЫРДЫҢ БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ
БИОТЕХНОЛОГИЯСЫ" АТТЫ
ХАЛЫҚАРАЛЫҚ ҒЫЛЫМИ
ФОРУМНЫҢ БАЯНДАМАЛАР
ЖИНАҒЫ

СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ
МЕЖДУНАРОДНОГО НАУЧНОГО
ФОРУМА "ОМАРОВСКИЕ ЧТЕНИЯ:
БИОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ
ХХІ ВЕКА"

УДК 57 (063)
ББК 28.0
Ж 66

Жалпы редакцияны басқарған т.ғ.д., профессор Е.Б. Сыдықов
Под редакцией д.и.н., профессора Е.Б. Сыдыкова

Редакция алқасы:
Редакционная коллегия:

Ж.К. Масалимов, А.Б. Курманбаева, Ж.А.Нурбекова, Н.Н. Иқсат.

«Омаров оқулары: ХХІ ғасыр биология және биотехнологиясы» халықаралық ғылыми форумының баяндамалар жинағы. – Астана: Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, 2024. – 284 б., қазақша, орысша, ағылшынша.

Сборник материалов международного научного форума «Омаровские чтения: Биология и биотехнология ХХІ века». – Астана. Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, 2024. – 284 с., казахский, русский, английский.

ISBN 978-601-337-977-7

Жинақ «Омаров оқулары: ХХІ ғасыр биология және биотехнологиясы» атты халықаралық ғылыми форумна қатысушылардың баяндамаларымен құрастырылған. Бұл басылымда биология, биотехнология, молекулалық биология және генетиканың маңызды мәселелері қарастырылған. Жинақ ғылыми қызметкерлерге, PhD докторанттарға, магистранттарға, сәйкес мамандықтағы студенттерге арналған.

Сборник составлен по материалам, представленным участниками международного научного форума «Омаровские чтения: Биология и биотехнология ХХІ века». Издание освещает актуальные вопросы биологии, биотехнологии, молекулярной биологии и генетики. Сборник рассчитан на научных работников, PhD докторантов, магистрантов, студентов соответствующих специальностей.

ISBN 978-601-337-977-7



УДК 57
ББК 28
О-58

©Коллектив авторов, 2024
©Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, 2024

2. TBSV P19 мутанттарының өсімдіктерде сутегінің асқын тотығының жинақталу деңгейіне әсері анықталды. Нәтижелерге сәйкес ешбір зақымсыз өсірілген өсімдіктегі ОБТ жинақталу деңгейі 1 мг-ға тең болды және TBSV P19 мутанттары әсерінен өсімдіктерде ОБТ жинақталу деңгейі 5-6 мг-ды ды көрсетсе, ауыр металдар әсерінен ОБТ жинақталу деңгейі 1,5-2,5 мг-ға тең болды.

3. ОБТ деңгейін анықтау арқылы P19 мутанттарының ауыр металдармен салыстырғанда анағұрлым көп зақым тигізетіні анықталды. Алынған нәтиже бойынша ауыр металдардан жоғары зақымды W1 тигізсе TBSV P19 мутанттарымен салыстырғанда зақым тигізу деңгейі 2-3 есеге төмен болды.

Пайдаланылған әдебиеттер тізімі.

1 Hayes R.J., Brunt A.A., Buck K.W. Gene-Mapping and Expression of Tomato Bushy Stunt Virus//J. Gen. Virol. -1988. –V.69. –P. 3047–3057.

2 Russo M., Burgyan J., Martelli G.P. Molecular biology of Tombusviridae//Adv. Virus Res. -1994. –V.44. –P. 381 – 428

3 Steffens B. The role of ethylene and ROS in salinity, heavy metal, and flooding responses in rice//Front. Plant Sci. -2014. –V.5. –P. 685.

4 Kumar J.S.P., Prasad R.S., Banerjee R., Thammineni C. Seed birth to death: Dual functions of reactive oxygen species in seed physiology//Ann. Bot. -2015. –V.116. –P. 663–668.

5 Choudhury S., Panda P., Sahoo L., Panda S.K. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. Plant Signal//Behav. -2013. –V.8. –P. 4.

6 Ron M. ROS are Good//Trends in Plant Science. -2017. –V.1. –P. 11-19.

УДК 57.577

Гид-индуцированное подавление генов у *Nicotiana benthamiana* против вируса кустистой карликовости томатов

Артыкбаева Дана Ерболатовна, Иқсат Нұргүл Нұрқанатқызы,

Масалимов Жаксылық Каирбекович

ЕНУ имени Л.Н.Гумилева, Астана, Казахстан

danoka20022@gmail.com

Актуальность. Инженерия транскриптома на основе GIGS представляет собой новый подход к понижению титров вирусной РНК и может обеспечить гибкий циc-направленный подход в селекции растений. Этот метод может повысить устойчивость растений к вирусам, что приведет к снижению сельскохозяйственных потерь и более стабильному производству продуктов питания.

Введение. Потери картофеля и сахарной свеклы от вирусов составляют 6-7% в мире, в то время как другие культуры теряют 1-3%, некоторые регионы сталкиваются с серьезными проблемами выращивания этих культур [1]. Благодаря открытию ортологов Cas, таких как Cas 12, 13 и 14, точность редактирования генома CRISPR/Cas значительно увеличилась, а плейотропные эффекты снизились [2]. Манипуляция РНК предлагает преимущества перед редактированием ДНК: предотвращение мутаций, точная регуляция, большая гибкость и точность воздействия на гены, включая РНК-вирусы для создания искусственного иммунитета [3]. Современные методы деградации РНК, такие как РНК-интерференция, могут привести к нецелевому сайленсингу генов и появлению плейотропных эффектов, аналогичных редактированию ДНК [4]. В недавних исследованиях показано использование Cas13 в качестве противовирусной системы у растений [5]. В наших исследованиях было показано, что crРНК без нуклеазы Cas13 самостоятельно может понижать титры вирусной РНК. Это снижение экспрессии вирусного генома, индуцированное crРНК, функционирует через путь РНК-

интерференцию (РНКи). Использование голых crРНК представляет новый путь для точного манипулирования признаками растений в дополнение к Cas13-зависимыми подходами.

Материалы и методы. В исследовании использовались 30-дневные растения *N. benthamiana*, выращенные в смеси почвы и вермикулита (3:1) и поливаемые 3–4 раза в неделю. Растения выращивали при 16 часах света и 8 часах темноты при температуре 25/20°C (день и ночь).

В качестве объекта был использован вирус кустистой карликовости томата (TBSV) из семейства *Tombusviridae*.

Выделение плазмидной ДНК проводилось согласно протоколу производителя (NEB). Далее проводился рестрикционный анализ плазмидных ДНК, в составе которых имелся генетический материал вируса.

In vitro транскрипция проводилась в соответствии с протоколом производителя (ThermoFisher Scientific). Для этого подготовили реакцию смесь, содержащую 10 мкл транскрипционного буфера, 0,5 мкл ингибитора, 10 мкл смеси NTP, 1 мкл линейной ДНК, и довели объем до 50 мкл очищенной водой. Затем добавили 1,5 мкл РНК-полимеразы T7 и инкубировали при 37 °C в течение 2–4 часов.

Горизонтальный гель-электрофорез был использован для детекции нуклеиновых кислот.

Инокуляция растений. Заражение проводилось транскриптами дикого типа TBSV и олигомерами ns-crРНК, P19-crРНК и crРНК-GFP в соотношении 1:1.

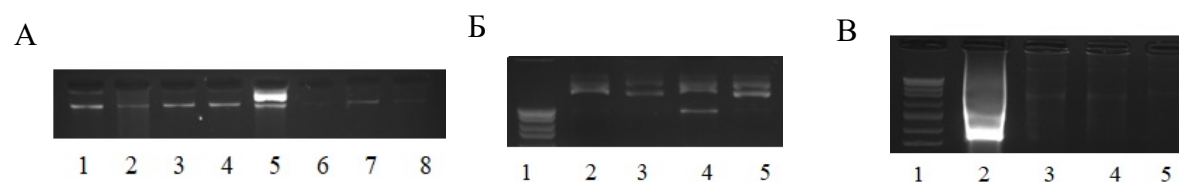
Для подготовки вирусного материала использовалась аффинная хроматография на матрице гидроксиапатита согласно патенту [6]. С последующим экспресс-анализом на капсидный белок вируса [7].

Разделение белков по молекулярной массе проводился с помощью вертикального полиакриламидного гель-электрофореза с использованием СДС в денатурирующих условиях согласно [8].

Для детекции вирусных частиц в растениях проводился иммуноблоттинг на вставку супрессорного белка TBSV - P19 согласно [9].

Результаты и обсуждение.

Полученные образцы проверялись на горизонтальном гель-электрофореза с использованием 1% агарозы (рисунок 1).



А: 1-4 плазмиды PuC19-wtTBSV; Б: 1 -маркер; 2- рестрикт RMJ1; 3- пДНК RMJ1; 4- рестрикт wtTBSV; 5- пДНК wtTBSV; 1- маркер; 2- положительный контроль (GUS); 3-4- wtTBSV; 5- RMJ1

Рисунок 1 Детекция TBSV

Для синтеза crРНК, нацеленных на вирусную последовательность, был использован метод *in vitro* транскрипции согласно производителю (ThermoFisher) (рисунок 2).



1- маркер; 2-3- ns-crPHK; 4-5- crPHK-P19; 6-7- crPHK-GFP

Рисунок 2 Детекция транскриптов гРНК ns-crPHK, crPHK-P19 и crPHK-GFP

Инокуляция *Nicotiana benthamiana* на 30 день проводилась следующим образом: листья среднего яруса растирали фосфатным буфером и транскриптами в соотношении 1:3, 0,001% карборандум использовали для механического повреждения. Детекция фенотипических признаков была проведена на 7 дни и системные листья растения были гомогенизированы для дальнейших анализов (рисунок 3).

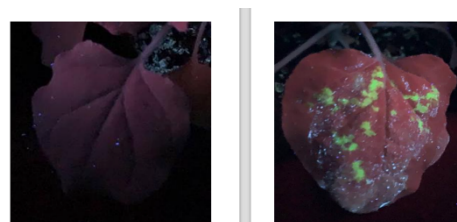


1 2 3

1 -контроль; 2-3- wtTBSV; 4-RMJ1

Рисунок 3 *N. benthamiana* на 7 дни

На 7 дни под УФ лучами вирусный мутант RMJ1, где экспрессия белка GFP, который был заменен на капсидный белок P41 TBSV, проявлял интенсивный и плотный уровень зеленой флуоресценции (рисунок 4).



1 2

1- контроль; 2- RMJ1

Рисунок 4 *N. benthamiana* под УФ-света на 7 дни

Для качественной оценки накопления титра вируса wtTBSV в инокулированных растениях проводились экспресс анализы по детекции вирусных частиц. Результаты показаны на рисунке 5.



А

Б

0 0 20 25 50

1 – маркер; 2- контроль; 3-5- wtTBSV

Рисунок 5 Детекция вирусных частиц

Далее растения были инокулированы crРНК в те же листья, что и транскрипты вируса, без внесения нуклеазы Cas13. На 7 дни фенотипические признаки детектировались под УФ-лампой, а также фотоаппаратом Nikon D600 (рисунок 6).



Рисунок 6 *N. benthamiana* под УФ-света на 7 дни

Локальные листья были собраны для дальнейших молекулярных анализов (рисунок 7).



1 - маркер; 2- контроль; 3- crРНК-P19+wtTBSV; 4- wtTBSV;
5- ns-crРНК+ wtTBSV

Рисунок 7 Иммуноблот на вставку P19

В ходе полученных результатов было определено, что при отсутствии белка Cas13 направляющие crРНК могут вызывать сайленсинг целевого РНК. Ранее уже сообщалось, что crРНК, предназначенная для управления Cas13, может, в отсутствие белка Cas13, также вызывать существенное снижение уровней целого РНК вируса мозаики турнепса (TuMV) у *N. benthamiana* [10]. Наши результаты показывают, что растения, инокулированные wtTBSV, проявляли типичные симптомы, в то время как растения, инокулированные ns-crРНК, демонстрировали схожие симптомы вирусной инфекции. Белок P19 связывается с crРНК, препятствуя их связыванию с РНК-индуцированным комплексом сайленсинга генов (RISC), который опосредует механизм противовирусного сайленсинга РНК в клетке. Поскольку P19 является белком, экспрессируемым в геноме TBSV, мы отметили снижение вирусной инфекции у растений, инокулированных crРНК-P19 и wtTBSV.

Выводы. Для преодоления ограничений, связанных с редактированием генома, особенно для генов с плейотропными эффектами или существенной пространственно-временной регуляцией, необходимы новые технологические подходы. Представленная работа показывает, что GIGS может достигать сайленсинга целевой РНК с помощью активации вторичного иммунитета растений без нуклеазы Cas13. В ходе полученных данных было определено влияние вторичного иммунитета на РНК-интерференцию. Таким образом, транскриптомная инженерия на основе GIGS может обеспечить гибкий цис-генный подход для биотехнологии растений.

Финансирование. Данная работа выполнена в рамках программно-целевого финансирования BR21882269 «Использование технологии редактирования генома для повышения продуктивности экономически важных культурных растений» МНВО РК.

Список использованной литературы.

1. Oerke E.-C., Dehne H.-W. Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection // Crop Protection. 2004. Vol. 23, № 4. P. 275–285.
2. Iksat N., Masalimov Z., Omarov R. Plant virus resistance biotechnological approaches: From genes to the CRISPR/Cas gene editing system // Journal of Water and Land Development. Polish Academy of Sciences; Institute of Technology and Life Sciences - National Research Institute, 2023. № No 57. P. 147–158.
3. Freije C.A. et al. Programmable Inhibition and Detection of RNA Viruses Using Cas13 // Molecular Cell. Elsevier, 2019. Vol. 76, № 5. P. 826-837.e11.
4. Jackson A.L., Linsley P.S. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application // Nature Reviews Drug Discovery. 2010. Vol. 9, № 1. P. 57–67.
5. Mahas A., Aman R., Mahfouz M. CRISPR-Cas13d mediates robust RNA virus interference in plants // Genome Biology. 2019. Vol. 20, № 1. P. 263.
6. Omarov R. et al. Express method of viral particals isolation from infected plant material in preparative amounts: pat. 2039 USA. 2017.
7. Omarov R. et al. Method of identification of viral infection in plant tissues by rapid method: pat. 3624 USA. 2019.
8. Shamekova M. et al. Tombusvirus-based vector systems to permit over-expression of genes or that serve as sensors of antiviral RNA silencing in plants // Virology. 2014. Vol. 452–453. P. 159–165.
9. Yergaliyev T.M. et al. The involvement of ROS producing aldehyde oxidase in plant response to Tombusvirus infection // Plant Physiology and Biochemistry. 2016. Vol. 109. P. 36–44.
10. Sharma V.K. et al. CRISPR guides induce gene silencing in plants in the absence of Cas // Genome Biology. 2022. Vol. 23, № 1. P. 6.

УДК 57.045

Оценка антиоксидантной устойчивости растений

Елтузарбек А.М., Бектурова А.Ж.

Магистрант курса 2 факультета естественных наук Евразийского национального университета им Л.Н. Гумилева, Астана, Казахстан
2001asylbek000@gmail.com

В современном мире растения сталкиваются с рядом стрессовых условий, которые могут серьезно ограничить их рост и развитие. Эти условия могут включать в себя экстремальные температуры, недостаток воды, солевую стрессу, а также атмосферные загрязнения. Однако, благодаря своей удивительной способности к адаптации, растения развили разнообразные механизмы защиты, включая систему антиоксидантов. Растения, подобно живым существам, вступают в постоянное взаимодействие с окружающей средой, где они подвергаются различным стрессовым условиям. Эти условия могут варьироваться от экстремальных температур и недостатка воды до солевого стресса и атмосферных загрязнений. В таких условиях растения вынуждены мобилизовать свои защитные механизмы для приспособления и выживания [1]. Среди этих механизмов ключевую роль играет система антиоксидантов, которая обеспечивает защиту клеток от повреждений, вызванных избыточным образованием активных форм кислорода (АФК) [2]. В последние десятилетия значительное внимание уделяется исследованию