



ҚР БҒМ ҒЫЛЫМ КОМИТЕТІНІҢ «МИКРООРГАНИЗМДЕРДІҢ  
РЕСПУБЛИКАЛЫҚ КОЛЛЕКЦИЯСЫ» РМК

«Л.Н. ГУМИЛЕВ АТЫНДАҒЫ ЕУРАЗИЯ ҰЛТТЫҚ  
УНИВЕРСИТЕТІ» ҚеАҚ

Қазақстан Республикасы Тәуелсіздігінің 30 жылдығына арналған  
«Микробиология, биотехнология және биоалуантүрліліктің өзекті  
мәселелері» атты Халықаралық ғылыми-тәжірибелік конференциясының  
МАТЕРИАЛДАРЫ

### МАТЕРИАЛЫ

Международной научно-практической конференции  
«Актуальные проблемы микробиологии, биотехнологии и  
биоразнообразия», посвященной 30-летию Независимости Республики  
Казахстан

### MATERIALS

of the International Scientific and Practical Conference "Actual Problems of  
Microbiology, Biotechnology and Biodiversity", dedicated to the 30th  
anniversary of the Independence of the Republic of Kazakhstan



Нұр-Сұлтан  
2021

Қазақстан Республикасының Білім және ғылым министрлігі

Ғылым Комитеті «Микроорганизмдердің Республикалық Коллекциясы» РМК  
«Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия Ұлттық Университеті» ҚеАҚ

РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов»  
Комитет науки Министерства образования и науки Республики Казахстан  
НАО «Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева»

Committee of Science of the Ministry of Education and Science of the Republic of  
Kazakhstan RSE «Republican collection of microorganisms»  
The NJSC “The L.N. Gumilyov Eurasian National University”

**Қазақстан Республикасы Тәуелсіздігінің 30 жылдығына арналған  
«Микробиология, биотехнология және биоалуантүрліліктің өзекті  
мәселелері» атты Халықаралық ғылыми-тәжірибелік конференциясының  
МАТЕРИАЛДАРЫ**

### **МАТЕРИАЛЫ**

**Международной научно-практической конференции  
«Актуальные проблемы микробиологии, биотехнологии и  
биоразнообразия», посвященной 30-летию Независимости Республики  
Казахстан**

### **MATERIALS**

**of the International Scientific and Practical Conference "Actual Problems of  
Microbiology, Biotechnology and Biodiversity", dedicated to the 30th  
anniversary of the Independence of the Republic of Kazakhstan**

**Нұр-Сұлтан – Нур-Султан – Nur-Sultan**

**2021**

**УДК 60**  
**ББК 30.16**

**ISBN 978-601-337-587-8**

**Ұйымдастырушы комитеті:**

Абитаева Г. К. Шапекова Н.Л., Сармурзина З.С.  
Темирханов А.Ж., Текебаева Ж.Б., Бисенова Г.Н., Сулеймен Е.М.,  
Тыныбаева И.К., Шайхин С.М., Искакова А.Н.,

**Қ 18**

**Қазақстан Республикасы Тәуелсіздігінің 30 жылдығына арналған «Микробиология, биотехнология және биоалуантүрліліктің өзекті мәселелері» атты халықаралық ғылыми-практикалық конференция. - 2021 ж. 17 қыркүйек. - Нұр-Сұлтан қ.: 192 - б.**

Жинаққа Қазақстан Республикасы Тәуелсіздігінің 30 жылдығына арналған «Микробиология, биотехнология және биоалуантүрліліктің өзекті мәселелері» атты халықаралық ғылыми-практикалық конференцияға қатысқан зерттеушілердің, университет оқытушыларының, студенттердің, магистранттардың, докторанттардың ғылыми мақалаларының тезистері келесі ғылыми бағыттар бойынша енгізілген: биоалуантүрлілікті сақтау - микроорганизмдер, өсімдіктер мен жануарлар; микробтық және "жасыл" технологиялар; молекулалық биология, гендік инженерия және микроорганизмдердің геномикасы; антибиотиктер, биофармацевтика және фармакология; ауыл шаруашылығы, тағам өнеркәсібі және медицинадағы биотехнология; биологиялық ғылымдар саласындағы жоғары оқу орындарының білім беру қызметі; биоинформатика және биостатистика.

**Организационный комитет:**

Абитаева Г.К., Шапекова Н.Л., Сармурзина З.С.  
Темирханов А.Ж., Текебаева Ж.Б., Бисенова Г.Н., Сулеймен Е.М.,  
Тыныбаева И.К., Шайхин С.М., Искакова А.Н.

**Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы микробиологии, биотехнологии и биоразнообразия», посвященная 30-летию Независимости Республики Казахстан. - 17 сентября 2021 г. - г. Нур-Султан: 192 -стр.**

В сборник вошли тезисы научных статей научных работников, преподавателей ВУЗов, студентов, магистрантов, докторантов, участвовавших в Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы микробиологии, биотехнологии и биоразнообразия», посвященной 30-летию Независимости Республики Казахстан по следующим научным направлениям: сохранение биоразнообразия - микроорганизмы, растения и животные; микробные и «зеленые» технологии; молекулярная биология, геномная инженерия и геномика микроорганизмов; антибиотики, биофармацевтика и фармакология; биотехнология в сельском хозяйстве, пищевой промышленности и медицине; образовательная деятельность в высших учебных заведениях области биологических наук; биоинформатика и биостатистика.

**УДК 60**  
**ББК 30.16**

**ISBN 978-601-337-587-8**

**©Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, 2021**

**З.Б. Стамғалиева<sup>1</sup>, Г.С. Мукиянова<sup>1</sup>, А.Б. Ділдабек<sup>2</sup>, Р.Т. Омаров<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Л.Н.Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Нур-Сұлтан, Қазақстан*

<sup>2</sup>*Назарбаев Университет, Нур-Сұлтан, Қазақстан*

### **Влияние совместного инфицирования вируса *Panicum Mosaic Virus* и *Satellite Panicum Mosaic Virus* на растения просо**

**Аннотация.** Исследования существующих механизмов взаимодействий вирусов и вирусов-сателлитов во время заражения растений-хозяев, изучение биохимических путей и молекулярных основ возникновения, развития и распространения инфекции, а также формирование иммунного ответа растений на патоген имеют важное практическое значение в области биотехнологии растений для придания резистентности растениям в условиях биотического стресса. Данный обзор посвящен представителю семейства *Tombusviridae* *Panicummosaic virus* (PMV) и сателлитному вирусу *Satellite Panicummosaic virus* (SPMV), влияние инфекции этими фитопатогенами по отдельности и совместно на морфологию растения Просо обыкновенный (*Proso millet*).

**Ключевые слова:** *Panicummosaic virus* (PMV), *Satellite Panicummosaic virus* (SPMV), вирус, сателлитный вирус, просо, ко-инфекция.

**Введение.** В настоящее время вирусы занимают особую нишу в мире живого и неживого, являясь внеклеточной формой жизни. Инфицирование фитопатогенами наносит ущерб не только агросектору местной области распространения, но та же имеет большое влияние на экономическое развитие и продовольственный запас местного населения. Практически все растения, которые культивируются людьми для продуктов питания, корма и волокна, страдают, по крайней мере, от одного вируса.

Вирусы растений являются облигатными внутриклеточными паразитами, жизненный цикл которых полностью зависит от клетки-хозяина, в том числе и для осуществления таких процессов как, экспрессия вирусных генов, репликация генома и межклеточное передвижение. Во время инфекции между растением и вирусом формируется комплексная и конкурентная сеть взаимодействий. Понимание процессов противостояния растений и вирусов является одной из ключевых целей фито-вирусологических исследований [1].

*Tombusviridae* – семейство, включающее в себя таксономические группы *Tombivirus*, *Dianthovirus*, *Aureusvirus*, *Avenavirus*, *Carmovirus*, *Necrovirus*, *Panicovirus* и *Machlomovirus*. Согласно описанию Мартелли и Руссо (Martelli and Russo, 1994), представители этого семейства состоят из небольших РНК-содержащих полиэдральных частиц, с несколько округлой формой и слаборастворимой поверхностной структурой [2].

Сателлиты - это класс субвирусных агентов, размножение которых зависит от наличия вспомогательного (хелперного) вируса. Особенностью

сателлитных вирусов является то, что они кодируют в своем геноме структурный белок, необходимый для инкапсидации сателлитного генома, который может быть представлен одноцепочечной РНК, ДНК или кольцевую РНК и реплицируется ферментами, обеспечиваемыми вирусом-хелпером.

Вирус мозаики *Panicum* (*PMV*; род *Panicovirus*) это прототипный представитель *Tombusvirus*, у которого геном представлен одноцепочечной молекулой РНК размером 4,3 т.п., инкапсидированной в 30-нм. вирион с икосаэдральной симметрией. Геном *PMV* кодирует шесть вирусных белков: два белка, связанных с репликацией (p48 и p112), три белка, ответственных за перемещение от клетки к клетке (p8, p6.6 и p15) и 26 kDa капсидный белок [3]. Внутри инфицированной клетки *PMV* часто выступает вспомогательным вирусом и поддерживает репликацию отдельных субвирусных агентов, включая сателлитный вирус (*SPMV*) и популяции сателлитных РНК [4]. Эти сателлиты, в зависимости от организма-хозяина, влияют на ход болезни, например, обострение симптомов (ко-инфекция *SPMV*) и ослабление (ко-инфекция сателлитной РНК) [5]. Во время механической передачи новому хозяину сателлитные РНК упаковываются 17-кДа капсидным белком *SPMV*, тем самым поддерживая трипартитную патосистему [6].

Сателлитный вирус мозаики *Panicum* (*SPMV*), который является сателлитным вирусом с одноцепочечной положительно-заряженной смысловой РНК, обычно ко-инфицирует хозяев, зараженных вирусом *PMV*. Особенностью ко-инфекции *PMV*+*SPMV* среди хелпер-сателлитных взаимодействий в природе является то, что она синергична, т.е. инфекция *SPMV* усиливает накопление *PMV* и обостряет симптомы заболевания [7].

Ранее, в предыдущих работах были охарактеризованы изменения в уровнях транскрипции в растениях *Brachypodium* при наблюдаемом синергизме заболевания, вызванного ко-инфекцией *PMV* и *SPMV* [8]. Инфицирование вирусами *PMV* и *SPMV* влияет на регуляцию гормонов иммунного ответа (таких как, салициловой кислоты, жасмоновой кислоты, этилена), и связанных с иммунитетом факторов транскрипции (например, WRKY), а также вызывает глобальные изменения в сплайсинге РНК хозяина [9].

**Материалы и методы.** Растения росли в стандартных световых условиях: 16 часов – дневной и 8 часов – ночной с влажностью воздуха около 75- 80%. Оценка симптоматики зараженных растений фиксировалась на 6 и 14 день после инокуляции. Схема инокуляции растений вирусами *PMV* и *SPMV* выглядит следующим образом: один горшок с просо был в качестве негативного контроля, второй горшок был с растениями, зараженными только *PMV*, третий для инфекции *SPMV*, и один - для совместного инфицирования *PMV* и *SPMV*.

*In vitro* транскрипция. Плазмиды, с вирусной кДНК были линейаризованы эндонуклеазами EcoRI и BglII, для получения рестриктов *PMV* и *SPMV*, соответственно. Присутствие линейаризованных плазмид было определено визуально при проведении электрофореза в агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Далее, рестрикты были очищены методом фенол-хлороформной экстракции и служили матрицей для синтеза вирусных

РНК транскриптов *PMV* и *SPMV*. Для проведения реакции был использован набор из смеси рибонуклеотидов, реакционного буфера и полимеразы T7.

*Инокуляция вирусным материалом.* Инокуляция *in vitro* транскриптами вирусов *PMV* и *SPMV* проводилась методом механического втирания с помощью карбида кремния. Полученные *in vitro* транскрипты были смешаны с 10мМ натрий-фосфатным буфером с рН 6.9 фосфатным буфером. Легкими движениями наносятся механические повреждения, через которые матричные РНК проникают в ткани и клетки растений.

*Выделение РНК.* По прошествии 14 дней после инфицирования, из зараженных растений были выделены тотальные РНК. Для выделения РНК использовался экстракционный буфер (100 мМ Tris-HCl [рН 8.0], 1 мМ EDTA, 0.1 М NaCl, 1% SDS), который добавлялся в соотношении 1:2. Далее, проводилась фенол-хлороформная очистка, центрифугирование и преципитация с 8 M LiCl. Полученные тотальные РНК визуализировались в агарозном геле.

*Разделение белков и иммунодетекция CP-PMV.* Для определения наличия вирусных белков в материале, ткани из здоровых и зараженных вирусом растений были разделены в 15% полиакриламидном геле и перенесены на нитроцеллюлозную мембрану (Osmonics, Westborough, MA). Мембраны инкубировали 2 ч. с раствором антител против капсидного белка (1:5000). После промывания, были добавлены вторичные антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой 1:3000. Раствор NBT-BCIP был использован для визуализации образованных иммунных комплексов.

**Результаты и обсуждение.** В данной работе приведены результаты заражения растений просо вирусом *PMV*, а также сатиллетным вирусом, использующим *PMV* в качестве хелперного агента, *SPMV* и их совместное воздействие на патогенез в тканях организма-хозяина. По истечении 14 дней растения, зараженные миксом из двух вирусов фенотипически проявляли все признаки заболевания, что свидетельствует о синергизме этих двух вирусов. Однако же, при одиночном заражении каждым из вирусов, симптоматика также проявлялась, но тотального коллапса растений не наблюдалось. В случае заражения только вирусом *PMV*, на участках листьев просо, проявлялась локальное отбеливание, мозаичность и некроз. При заражении сатиллетным вирусом *SPMV*, в зараженных тканях наблюдалась более систематическая мозаика в листьях, больше растений было подвержено тотальному коллапсу и некрозу.

Для заражения использовались просо *Panicum millet* 2020 года урожая, выросшие до уровня трех листов (Рисунок 1).

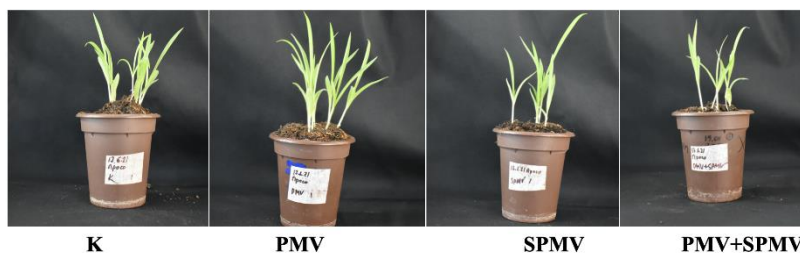


Рисунок 1 - Просо до заражения (К - отрицательный контроль)

На 6 dpi фиксировались первые симптомы вирусного поражения: мозаичность листьев, обесцвечивание листьев и местный некроз в местах инокуляции вирусного материала (Рисунок 2).

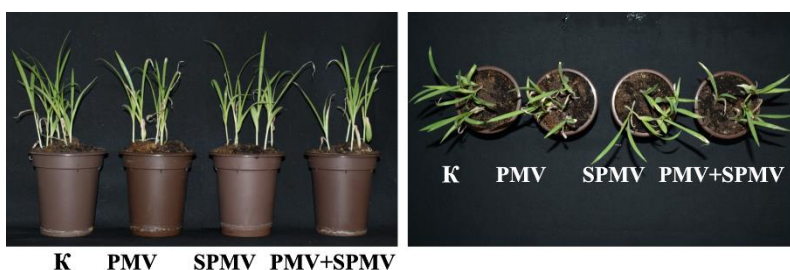


Рисунок 2 - Зараженные просо на 6 dpi (К - отрицательный контроль)

В растениях, зараженных вирусом PMV проводилась иммунодетекция специфичными антителами к белку с массой 26 kDa (Рисунок 3).

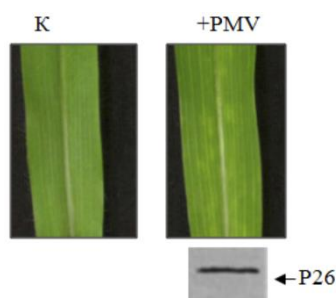


Рисунок 3 - Симптомы вирусной инфекции PMV в растениях просо (К - отрицательный контроль, в нижнем углу результат иммунодетекции CP-PMV)

Также, проводилось выделение тотальных РНК из проса и их детекция в 1% агроном геле. В зараженных тканях были детектированы бэнды с вирусными РНК, которые отсутствовали в контрольном образце без заражения (Рисунок 4).

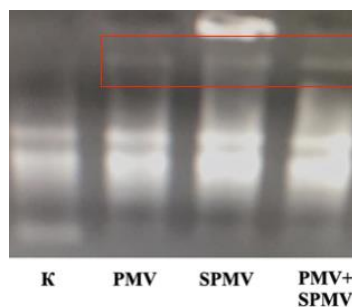


Рисунок 4 - Тотальные РНК выделенные из зараженных просо (К - отрицательный контроль)

**Заключение.** Работы с вирусом PMV и SPMV имеют не только фундаментальную ценность в изучении сложных вирус-сателлит-хозяин взаимодействий, но также имеет практическое значение для начала работ по выделению вирусных частиц и разработке новых подходов в вирусологии растений для ранней диагностики инфекции. Синергизм между хелперным вирусом PMV и сателлитным SPMV, возникающий при заражении организма-хозяина, является важным элементом в сложных молекулярных взаимодействиях и представляет собой отдельный объект для исследований.

**Источник финансирования.** Научные исследования проводились в рамках выполнения проекта по ГФ на 2020-2021 год по проекту AP08957713 «Разработка нового спектрофотометрического метода определения вирусных заболеваний растений».

### Список литературы

1. Nelson R.S., Citovsky V. Plant viruses. Invaders of cells and pirates of cellular pathways // *Plant Physiology*. – 2005. - V. 138, № 4. - P. 1809-1814.
2. Russo M., Burgyan J., Martelli G.P. Molecular biology of Tombusviridae // *Advances in virus research*, Academic Press. – 1994. - V. 44. – P. 382-383.
3. Turina M., Desvoyes B., Scholthof K-B. A gene cluster encoded by Panicum mosaic virus is associated with virus movement // *Virology*. – 2000. - V. 266. - P. 120–128. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0069>
4. Pyle J.D., Scholthof K-B. De novo generation of helper virus-satellite chimera RNAs results in disease attenuation and satellite sequence acquisition in a host-dependent manner // *Virology*. – 2018. - V. 514. - P.182 - 191 [doi.org/10.1016/j.virol.2017.11.006](https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.11.006)
5. Mandadi K.K., Scholthof K-B. Characterization of a viral synergism in the monocot *Brachypodium distachyon* reveals distinctly altered host molecular processes associated with disease // *Plant Physiol.* – 2012. - V. 160. - P. 1432–1452. <https://doi.org/10.1104/pp.112.204362>



6. Pyle J.D., Monis J, Scholthof K-B. Complete nucleotide sequences and virion particle association of two satellite RNAs of panicum mosaic virus // *Virus Res.* – 2017. - V. 240. - P. 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.06.026>
7. Scholthof K-B.G. A synergism induced by satellite panicum mosaic virus // *Molecular Plant-Microbe Interactions.* – 1999. - V. 12. - P. 163–166.
8. Mandadi KK, Pyle JD, Scholthof K-B. 2014. Comparative analysis of antiviral responses in *Brachypodium distachyon* and *Setaria viridis* reveals conserved and unique outcomes among C3 and C4 plant defenses // *Mol. Plant. Microbe Interact.* – V. 27. – P. 1277–1290. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-14-0152-R>
9. Mandadi K.K., Scholthof K-B. Genome-wide analysis of alternative splicing landscapes modulated during plant-virus interactions in *Brachypodium distachyon* // *Plant Cell.* – 2015. - V. 27. - P. 71– 85. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.133991>.

***Данные об авторах:***

Стамгалиева З.Б. - магистр, научный сотрудник, Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Нур-Султан, Казахстан.

Мукиянова Г.С.- PhD, старший научный сотрудник, Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Нур-Султан, Казахстан.

Ділдабек А.Б. - магистр, научный сотрудник, Назарбаев университет, Нур-Султан, Казахстан.

Омаров Р.Т.- PhD, к.б.н., заведующий кафедрой Биотехнологии и микробиологии, Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Нур-Султан, Казахстан.