

УДК: 631. 811. 98 75. 117. 2. 577. 2. 08

ЗБІЛЬШЕННЯ СИНТЕЗУ МАЛИХ РЕГУЛЯТОРНИХ РНК З ІМУНОМОДУЛЮЮЧИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ В КЛІТИНАХ РОСЛИН ПІД ВПЛИВОМ РЕГУЛЯТОРІВ РОСТУ

ЦИГАНКОВА В.А.,

кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник;

ГАЛКІН А.П.,

доктор біологічних наук, зав. відділом біоінженерії,

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України;

ГАЛКІНА Л.А.,

старший науковий співробітник, Інститут ботаніки ім. Н.Г.Холодного НАН України;

САБЛУК В.Т.,

доктор сільськогосподарських наук, зав. відділом фітопатології і ентомології;

КАЛАТУР К.А.,

кандидат сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник,

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України;

СТЕФАНОВСЬКА Т.Р.,

кандидат сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник,

Національний університет біоресурсів і природокористування України;

ПОНОМАРЕНКО С.П.,

кандидат хімічних наук, директор Державного підприємства

«Міжвідомчий науково-технологічний центр «Агробіотех» НАН і МОН України.

ріод життя кожної з молекул mRNA, насамперед знищують шляхом блокування (сайленсінгу) трансляції абберрантні та недосконалі за структурою мРНК, які можуть з'являтися помилково в клітинах; 2) виконують захисні (антипатогенні та антипаразитичні) функції [1 – 8]. В обох випадках ці біологічні ефекти досягаються шляхом зв'язування з комплементарною полінуклеотидною ланкою mRNA власних клітин, чи mRNA хвороботворюючих вірусів, або mRNA паразитичних організмів, наприклад, нематод. Але в багатьох випадках на масову інфекцію (при епізоотії шкідників) у клітинах рослин синтезується недостатньо молекул siRNA проти паразитів і тому, відповідно, не досягається захисний ефект.

Вчені пропонують 2 підходи підвищення кількості siRNA у відповідь на патогенез [1, 3, 5, 6, 7]: 1) методом введення у клітини додаткового числа генів siRNA шляхом генетичної трансформації; 2) активацією експресії, власне, клітинних генів синтезу siRNA якимись специфічними індукторами.

Метою нашої роботи є підвищення імунозахисних та антипатогенних властивостей рослин шляхом посилення синтезу малих регуляторних siRNA за допомогою регуляторів росту рослин, в результаті чого будуть отримані рослини з стимульованим синтезом siRNA, які підвищують стійкість до патогенів та фітогельмінтів.

Матеріали та методика досліджень. Об'єктом дослідження є рослини цукрового буряка, бурякова цистоутворююча нематода *Heterodera schachtii*

Schmidt, регулятори росту рослин Радостим, Біолан, Біоген, Радостим-супер, Біолан-екстра.

Польові досліді проводились у 2010 році в умовах Уладово-Люлинецької дослідно-селекційної станції (Вінницька обл.) на природному інвазійному фоні шляхом закладки дрібноділянкових дослідів та у відділі фітопатології і ентомології Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України. Для встановлення чисельності бурякової нематоди відбирались і аналізувались зразки ґрунту перед сівбою цукрових буряків (квітень), після розвитку першого покоління нематоди (липень) та після збирання коренеплодів (вересень) згідно ДСТУ 6057:2008 «Буряки цукрові. Методи визначення шкідливості бурякової нематоди». Щільність популяції бурякової нематоди в ґрунті визначали за кількості цист, личинок і яєць, виділених із 100 см³ ґрунту (цист/100 см³; л+я/100 см³ ґрунту) за допомогою флотаційно-воронкового методу.

У фазі 6-8 листків цукрових буряків проведено обприскування рослин регулятором росту Біолан-екстра (50 мл / 250 л води на 1 га).

Ефективність дії регуляторів росту рослин проти бурякової нематоди в прикореневому ґрунті визначалася у відсотках за різницею між допосівною чисельністю бурякової нематоди у ґрунті та щільністю її популяції після розвитку першого покоління.

Облік врожаю цукрових буряків (у вересні) проводили шляхом зважування всіх коренеплодів з кожної ділянки і перераховували на гектар посіву.

Цукристість коренеплодів визнача-

Таблиця 1.

Вплив регуляторів росту рослин на чисельність бурякової нематоди в ґрунті

Варіанти дослідів	Норма витрати препарату, мл/т	Продуктивність культури		
		врожайність, т/га	цукристість, %	збір цукру, т/га
Контроль (насіння оброблене водою)	-	33,6±1,2	14,2±0,02	4,8±0,01
Насіння оброблене регулятором росту: Радостим	25,0	36,3±1,6	15,2±0,03	5,5±0,02
Радостим-супер	25,0	40,0±1,8	15,6±0,05	6,2±0,03
Біоген	25,0	40,1±1,7	15,3±0,02	6,1±0,03
Біолан	25,0	35,3±1,1	15,2±0,01	5,4±0,02

Вступ. Протягом останніх 15 років велика увага приділяється виділенню з клітин еукаріотів та визначенню біологічної ролі малих регуляторних РНК (miRNA), за відкриття яких вченим Andrew Fire та Craig Mello у 2006 р. було присуджено Нобелівську Премію в області Фізіології та Медицини [1 – 3]. До найбільш важливого та розповсюдженого класу в цій гетерогенній популяції miRNA належать двуланцюгові dsRNA (double-stranded RNA - dsRNA), з яких за допомогою фермента рибонуклеази III - Dicer нуклеази утворюються siRNA (small interfering RNA) розміром 18 – 25 нуклеотидів з антисенсовою (антисмисловою) комплементарною структурою до мРНК, які відіграють двояку роль: 1) разом із сайт-специфічними ендо- та екзонуклеазами siRNA визначають пе-

ли на поточній лінії «Венема» методом холодної дигестії в умовах дослідної станції.

Молекулярно-біологічними методами у відділі біоінженерії Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України вивчали індукцію регуляторами росту рослин синтезу малих регуляторних siRNA з антинематодною активністю. З цією метою насіння цукрового буряка з високою схожістю пророщували в чашках Петрі на безнематодному водному середовищі (контроль) та із суспензією цист нематод, з яких у процесі інкубації за температури 23°C з'являлись личинки нематод (приблизно на 5–7-му добу). У паралельних пробах додавали також регулятор росту Радостим-супер високої активності.

Попередньо до цих експериментів нами було розроблено метод виділення препаратів siRNA високої чистоти для перевірки спорідненості siRNA до mRNA та функціональної (сайленсової) активності в безклітинній системі білкового синтезу.

На сьогоднішній день існує багато методів виділення siRNA [9 - 11]. Розроблений нами метод виділення siRNA складається з наступних процесів [12 - 14]: 1) виділення сумарного препарату РНК з клітин рослин; 2) розділення полі(А)⁺РНК (тобто мРНК) та полі(А)-РНК на оліго(dT)-целюлозній колонці з метою подальшого використання полі(А)⁺РНК для тестування функціональної активності siRNA в безклітинних системах білкового синтезу; 3) осадження з елюату високомолекулярної полі(А)⁺РНК 10% розчином поліетиленгліколя (мол. маса 8000); 4) наступне осадження з розчину siRNA рівним об'ємом 96% етанолу при -22 °C на протяжі доби; 5) молекулярна гібридизація в розчині низькомолекулярних siRNA з фракцією полі(А)⁺РНК; 6) денатурація гібридних молекул полі(А)⁺РНК з siRNA та відокремлення полі(А)⁺РНК від siRNA оліго(dT)-целюлозній колонці; 7) повторне осадження siRNA

96% етанолом та перевірка її сайленсової активності в безклітинних системах білкового синтезу.

Для дослідів по гібридизації siRNA з mRNA перед одержанням siRNA, її інтенсивно мітили in vivo ³³P за допомогою Na₂HP³³O₄ [13]. Для дослідів з перевірки її інгібуючої активності в безклітинних системах білкового синтезу ми використовували не мічену siRNA [14].

Результати досліджень та їхнього обговорення. В проведених нами польових і лабораторних дослідях було визначено, що створені в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України разом із Державним підприємством «Міжвідомчим науково-технологічним центром «Агробіотех» НАН і МОН України регулятори росту рослин Біолан, Біоген, Радостим-супер та Радостим значно підвищують стійкість рослин до широкого кола шкідливих організмів, як вірусного походження, так і паразитичних організмів (наприклад, нематод), так і шкідників-комах.

За результатами лабораторного аналізу відібраних зразків ґрунту встановлено, що допосівна чисельність бурякової нематоди на дослідних ділянках становила у середньому 4647 я+л/100 см³ ґрунту, тобто у 23 рази перевищувала економічний поріг шкідливості нематоди (200 я+л/100 см ґрунту) (табл. 1). Результатами досліджень встановлено, що ефективність дії регуляторів росту рослин за обробки ними насіння цукрових буряків та обприскування в період вегетації проти бурякової нематоди неодноразова і коливається у межах від 22,4 до 74,2% (табл. 1). Високу ефективність дії у зниженні чисельності бурякової нематоди отримано при застосуванні регулятора росту Радостим-супер. Чисельність нематоди у ґрунті у даному випадку знизилась з 4375 до 1131 я+л/100 см ґрунту або на 74,2%. Дещо нижчу протинематодну дію забезпечила обробка насіння регулятором росту Біоген. Його використання дозволило зменшити щільність попу-

ляції паразита у 2,2 рази або на 55,2%. Застосування регуляторів росту Біолан та Радостим забезпечило зниження чисельності бурякової нематоди у ґрунті відповідно на 22,4% та 32,2% або в 1,3-1,5 рази.

Дослідами також встановлено, що застосування регуляторів росту на початку вегетації цукрових буряків не тільки зменшило чисельність бурякової нематоди у ґрунті, а й позитивно вплинуло на їхню продуктивність. Так, на всіх варіантах досліду із застосуванням регуляторів росту врожайність цукрових буряків та збір цукру істотно перевищували контрольний варіант - відповідно на 1,7-6,5 та 0,6-1,4 т/га (табл. 2).

Найвищі ці показники отримано на варіантах, де застосовували регулятори росту Біоген та Радостим-супер відповідно 40,3 і 40,0 т/га та 6,1 і 6,2 т/га. Використання регуляторів росту рослин Радостиму та Біолану забезпечило прибавку врожаю коренеплодів відповідно на 2,7 та 1,7 т/га порівняно із варіантом, де ці препарати не застосовували.

При проведенні лабораторних дослідів ми виходили з того, що ураження організму різними типами патогенів чи паразитів індукує синтез специфічних до структури їх mRNA пул siRNA; і це дозволило також нам припустити, що регулятори росту стимулюють синтез siRNA, завдяки чому здійснюється підвищення імунітету рослин за вказаним механізмом дії siRNA. Отже, одержання відповідей на ці поставлені питання може допомогти створенню нового покоління регуляторів росту з властивостями вибіркової активації синтезу siRNA, специфічних до mRNA того чи іншого патогена або паразита.

В таблиці 3 наведені дані стосовно рівня синтезу siRNA у рослин в контролі, в дослідях з рослинами, обробленими регулятором росту Радостимом-супер, у рослин при інкубації з нематодами, а також у рослин в умовах дії регулятора росту Радостим-супер на фоні інвазування нематодами. Як свідчать отримані результати, під впливом регулятора росту Радостим-супер різко підвищується синтез клітинних siRNA, а інвазія рослин нематодами, навпаки, різко знижує синтез цього класу RNA. Стимулятор росту Радостим-супер дещо вирівнює синтез siRNA, проте цей рівень, хоча й вище показника контролю, але не досягає рівня синтезу, індукованого регулятором росту без нематод.

У таблиці 4 наведені дані, які розкривають суть результатів, вказаних в таблиці 3. Це, як можна бачити, пов'язано з тим, що нематодна інвазія знижує синтез, власне, клітинних siRNA, який значно підвищується при стимуляції регулятором росту та розвитку рослин Радостимом-супер, але цей прискорений ріст подавляється личинками і в той же час підсилює синтез захисних антинема-

Таблиця 2.

Вплив регуляторів росту рослин на продуктивність цукрових буряків

Варіанти досліду	Норма витрати препарату, мл/т	Чисельність бурякової нематоди, я+л/100 см ³ ґрунту		Зменшення щільності популяції нематоди, разів
		до сівби	після розвитку I генерації	
Насіння оброблене регулятором росту: Радостим	25,0	3671±112	2487±96	1,5
Радостим-супер	25,0	4375±134	1131±34	3,9
Біоген	25,0	4625±142	2074±63	2,2
Біолан	25,0	4336±116	3367±107	1,3

тодних siRNA з комплементарною структурою до mRNA нематод.

Висновки.

Таким чином, результати досліджень показали, що завдяки обробці насіння регуляторами росту рослин (Радостимом, Радостимом-супер, Біогеном, Біоланом) та обприскування (Біоланом-екстра) посівів цукрових буряків у фазі 6-8 листків чисельність бурякової нематоди в ґрунті знижується на 22,4-74,2%, що дозволяє підвищити врожайність коренеплодів цукрових буряків та збір цукру. Вперше показано, що підвищення імунітету рослин проти нематодної інвазії досягається шляхом підсилення синтезу малих регуляторних siRNA, споріднених (комплементарних) до структури mRNA нематод, що призводить до блокування (сайленсінгу) трансляції mRNA нематод.

Таблиця 3.

Вплив регулятора росту Радостим-супер на включення $Na_2HP^{33}O_4$ в siRNA в клітинах 5-денних проростків цукрового буряка, інкубованих і неінкубованих з нематодами

Варіанти дослідів*	Імп/хв/мг siRNA
Контроль (проростки рослин, інкубовані на водному середовищі)	2680 ± 98,0
Проростки, одержані на водному середовищі з Радостимом-супер	4309 ± 121
Проростки, вирощені на водному середовищі з личинками нематод	1970 ± 83
Проростки, вирощені на водному середовищі з Радостимом-супер і личинками нематод	3760 ± 112

*Примітка: 5-ти денні проростки рослин інкубували з $Na_2HP^{33}O_4$ протягом 1 год. в чашках Петрі. Регуляторні siRNA – антисенсові, комплементарні до mRNA виділяли по розробленій нами методиці отримання високоочищених нативних препаратів siRNA. Аліквоти радіоактивних siRNA вміщували на нітроцелюлозні підложки з наступним підрахунком радіоактивності.

Таблиця 4.

Посилення антинематодних властивостей siRNA 5-денних проростків цукрового буряка під впливом регулятора росту Радостим-супер і личинок нематод

Варіанти дослідів	Ступінь гомології по гібридизації mRNA з P^{33} siRNA (імп/хв/20мкг mRNA)	Показник інгібування білкового синтезу в безклітинній системі імп/хв/мг білку*	
		mRNA з рослин + P^{33} siRNA з рослин	mRNA з личинок + P^{33} siRNA з рослин
Гібриди mRNA з P^{33} siRNA контрольних рослин	8724 ± 146 (100%)	100 %	10 %
Гібриди mRNA з P^{33} siRNA контрольних рослин, інкубованих з Радостимом-супер	6850 ± 224 (83%)	82 %	15 %
Гібриди mRNA з P^{33} siRNA контрольних рослин проростків, інкубованих з личинками нематод	6358 ± 182 (73%)	65 %	36 %
Гібриди mRNA контрольних рослин з P^{33} siRNA рослин, інкубованих з Радостимом-супер і личинками нематод	5583 ± 164 (64%)	46 %	58 %

Примітка: використовували безклітинну систему білкового синтезу з проростків в якості міченого попередника виконувалась амінокислота – S^{35} метионін. * В безклітинній системі білкового синтезу застосовувались ті ж варіанти дослідів, що і в досліді по гібридизації.

Бібліографія

1. Elbashir S. M., Lendeckel W., Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs / S.M. Elbashir., W. Lendeckel, T. Tuschl // *Genes @ Development*. – 2001. – V. 15. – P. 188 – 200.
2. Hamilton A., Voinnet O., Chappell L. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing / A. Hamilton, O. Voinnet, L. Chappell // *The EMBO Journal*. – 2002. – V. 21, № 17. – P. 4671 – 4679.
3. Leung R. K. M., Whittaker P. A. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics / R. K. M. Leung, P. A. Whittaker // *Pharmacology and Therapeutics*. – 2005. – № 107. – P. 222 – 239.
4. Aravin A., Tuschl T. Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing / A. Aravin, T. Tuschl // *FEBS Letters*. – 2005. – V. 579. – P. 5830 – 5840.
5. Bakhetia M., Charlton W. L., Urwin P. E. RNA interference and plant parasitic nematodes / M. Bakhetia, W. L. Charlton, P. E. Urwin // *Trends in Plant Science*. – 2005. – V. 10, № 8. – P. 362 – 367.
6. Gheysen G., Vanholme B. RNAi from plants to nematodes / G. Gheysen, B. Vanholme // *Trends in Biotechnology*. – 2006. – V. 25, № 3. – P. 89 – 92.
7. Knox D. P., Geldhof P., Visser A., Britton C. RNA interference in parasitic nematodes of animals: a reality check? / D.P. Knox, P. Geldhof, A. Visser, C. Britton // *Trends in Parasitology*. – 2007. – V. 23, № 3. – P. 105 – 107.
8. Jian X., Zhang L., Li G. Identification of novel stress-regulated microRNAs from *Oryza sativa* L. / X. Jian, L. Zhang, G. Li // *Genomics*. – 2010. – V. 95. – P. 47 – 55.
9. Chen R., Hu Z., Zhang H. Identification of MicroRNAs in Wild Soybean (*Glycine soja*) / R.Chen, Z. Hu, H. Zhang // *J. of Integrative Plant Biology*. – 2009. – V. 51, № 12. – P. 1071–1079.
10. Bakhetia M., Charlton W. L., Urwin P. E. RNA interference and plant parasitic nematodes / M. Bakhetia, W. L. Charlton, P. E. Urwin // *Trends in Plant Science*. – 2005. – V. 10, № 8. – P. 362 – 367.
11. Lu C., Meyers B. C., Green P. G. Construction of small RNA cDNA libraries for deep sequencing / C. Lu, B. C. Meyers, P. G. Green // *Methods*. – 2007. – V. 43. – P. 110 – 117.

12. Tsygankova V. A., Blume Ya.B. An unusual minor protein appearing in embryonic axis cells of haricot bean seeds following germination process stimulated by 6-methylthiouracil / V. A. Tsygankova, Ya.B. Blume // *Biopolymers and cell*. – 1998. – V. 14, № 5. – P. 438 – 448.

13. Tsygankova V. A. Concerning the peculiarities of gene expression changes in plant leaf cells during twenty-four-hour period / V. A. Tsygankova // *Biotechnology*. – 2010. – V. 3, № 4. – P. 86 – 95.

14. Цыганкова В. А., Мусатенко Л. И., Пономаренко С. П., Галкина Л. А., Андрусевич Я. В., Галкин А. П. Изменение популяционной функционально активных цитоплазматических мРНК в клетках растений под влиянием регуляторов роста и биотехнологические перспективы бесклеточных систем белкового синтеза / В. А. Цыганкова, Л. И. Мусатенко, С.П. Пономаренко, Л. А. Галкина, Я. В. Андрусевич, А. П. Галкин // *Биотехнология*. – 2010. – Т.3, № 2. – С. 19 – 32.

Анотація

В польових дослідіах визначено, що обробка насіння та посівів цукрового буряку регуляторами росту рослин (PPP) знижує чисельність бурякової нематоди в ґрунті. Молекулярно-біологічними методами вперше встановлено, що PPP значно підвищують стійкість рослин до нематод шляхом стимуляції синтезу малих регуляторних siRNA.

Анотация

В полевых опытах определено, что обработка семян и посевов сахарной свеклы регуляторами роста растений (PPP) снижает численность свекловичной нематоды в почве. Молекулярно-биологическими методами впервые установлено, что PPP существенно повышают стойкость растений к нематодам путём стимуляции синтеза малых регуляторных siRNA.

Annotation

In field experiments determined that the processing of seeds and sugar beet crops by plant growth regulators (PGR) reduces the number of beet nematode in the soil. Using molecular-biological methods it is found at first that PGR significantly increase plant resistance to nematode by stimulating the synthesis of small regulatory siRNA.