

В.А. ЦИГАНКОВА¹, А.І. ЄМЕЦЬ², Г.О. ІУТИНСЬКА³,
Л.О. БІЛЯВСЬКА³, А.П. ГАЛКІН², Я.Б. БЛЮМ²

¹ Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ
E-mail: vTsygankova@ukr.net

² Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, Київ

³ Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

ПІДВИЩЕННЯ СТІЙКОСТІ РОСЛИН РІПАКА ДО ПАРАЗИТИЧНОЇ НЕМАТОДИ *HETERODERA SCHACHTII* З ВИКОРИСТАННЯМ ТЕХНОЛОГІЙ РНК-ІНТЕРФЕРЕНЦІЇ

Сконструйовано вектор для конститутивної експресії антисенсових до консервативної ділянки гена 8H07 нематою *Heterodera schachtii dsРНК* та проведено генетичну трансформацію рослин ріпака за допомогою *A. tumefaciens*. Молекулярно-генетичними методами у геномі трансгенних рослин ріпака встановлено наявність вектора експресії антинематодних *dsРНК*, а також підтверджено високий рівень їхньої сайленсингової активності як в організмі нематод, так і в інфікованих ними рослин. В лабораторних дослідках за фізіологічними показниками підтверджено значне підвищення стійкості трансгенних рослин ріпака до коренепаразитуючої нематою *H. schachtii*.

Ключові слова: РНК-інтерференція, малі регуляторні si/miРНК, коренепаразитуюча нематою *H. schachtii*, вектори експресії антинематодних *dsРНК*, *A. tumefaciens*-опосередкована генетична трансформація, стійкі до нематод трансгенні рослини ріпака.

Вступ. До найпоширеніших патогенних організмів, що спричиняють хвороби культурних рослин і заважають успішному розвитку сучасного рослинництва у різних країнах світу, належать паразитичні нематоди. Щорічні втрати врожаїв від цих шкідників у світі становлять понад 20 %, що в грошовому еквіваленті прирівнюється до 125 млрд доларів США [1]. На даний час ідентифіковано понад 4100 різних видів паразитичних нематод. Для сільського господарства України найбільші збитки завдяки глобальному розповсюдженню та спроможності вражати широке коло культурних рослин, зокрема такі важливі культури, як цукровий буряк та ріпак, спричиняють ендопаразитичні нематоди надродина *Tylenchoidea*, до якої належать родини кореневих цистоутворюючих нематод *Heteroderidae* та *Globoderidae*, а також родини галових нематод *Meloidogynidae* [2]. Фізіо-

логічними проявами нематодної інвазії у рослин можуть бути чахлий ріст, хлороз, зів'янення, потоншення та скручування листків або зміна їхнього кольору (почервоніння чи побуріння), недозрівання та передчасне обпадання плодів, підвищена чутливість до інших хвороб, спричинених інтенсивним споживанням нематодами води та поживних речовин із судин рослин, за відсутності котрих гальмується ріст та розвиток останніх [3].

До існуючих на теперішній час засобів контролю розповсюдження нематод та зменшення ураження ними важливих сільськогосподарських культур належать хімічно синтезовані ґрунтові фунгіганти, нематотициди (класу органофосфатів та карбаматів) та різні види інсектицидів природного походження, наприклад, фітоінсектицид пиретрин та його синтетичні аналоги – пиретроїди [4]. Однак у більшості країн світу спостерігається тенденція обмеження їхнього практичного застосування через їх високу токсичність для організму людини та забруднення ними навколишнього середовища. До традиційних засобів регулювання чисельності паразитичних нематод належать також різні технології біоконтролю [4], що включають застосування різноманітних органічних ґрунтових добрив та промислових відходів рослинного та тваринного походження, компосту, а також зміну рН ґрунтів (підкислення до рН 4 або підлуження до рН 8), інтродукцію у ґрунт антагоністичних та конкурентних мікроорганізмів (бактерій штамів *Burkholderia cepacia* та *Bacillus chitinosporus*, грибів-мікроміцетів *Myrothecium verrucaria* та *Paecilomyces lilacinus*), сівозміни з включенням культур, резистентних до нематод, використання біопрепаратів, які містять ефірні олії різних лікарських рослин з нематотичним ефектом (наприклад, олії сезаму, часнику, розмарину і білого

перцю) та ін. На жаль, комбінації перелічених засобів здатні лише пригнічувати високу життєспроможність цього класу шкідників.

Альтернативними, не шкідливими для здоров'я людини та навколишнього середовища антипаразитарними засобами, є біопрепарати вітчизняного виробництва: 1) біопрепарат Аверком, розроблений в Інституті мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України на основі метаболітів ґрунтового стрептоміцету *Streptomyces avermitilis* УКМ АС 2179, який містить антипаразитарний антибіотик авермектин і комплекс біологічно активних сполук – амінокислот, ліпідів (у тому числі вільних жирних кислот), вітамінів групи В, фітогормонів [5]; 2) регулятори Біоген, Стімпо і Регоплант, створені в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України спільно з Міжвідомчим науково-технологічним центром «Агробіотех» НАН та МОН України; ці регулятори містять антипаразитарні антибіотики аверсектини (продукти метаболізму ґрунтового стрептоміцету *S. avermitilis*) і продукти життєдіяльності (амінокислоти, жирні кислоти, полісахариди, фітогормони та мікроелементи) в культурі *in vitro* гриба-міксоміцета, вилученого з кореневої системи женьшеню [6].

В той же час новим перспективним напрямком боротьби зі шкідниками сільського господарства є підвищення стійкості рослин за допомогою методів генної інженерії, серед яких особливий інтерес викликають технології РНК-інтерференції (RNAi) або посттранскрипційного сайленсингу генів. Головна роль в останньому належить малим регуляторним si/miРНК (розміром ~21–25 нт), за участі яких спільно з екзо- та ендонуклеазами комплексу RISC (RNA-induced silencing complex) та білками AGO (Argonate) відбувається або блокування трансляції мРНК патогенних та паразитичних організмів, або їхнє ензиматичне розщеплення та деградація [7, 8].

На даний час розроблено методи та проведено конструювання векторів експресії анти-нематодних si/miРНК. З цією метою як гені-мішені для сайленсингу обираються найважливіші для життєвого циклу нематод гени, зокрема гени контролю реплікації ДНК, транскрипції, процесингу РНК, синтезу тРНК, трансляції, контролю функціонування рибосом та

тРНК, процесів модифікації, секреції та переносу білків, контролю їхньої стабільності і деградації, контролю функцій мітохондрій та метаболізму білків-посередників, гени контролю клітинного циклу (білків цитоскелету – тубулінів), контролю структури клітин, передачі ендо- та міжклітинних сигналів, процесів ендоцитозу, іонної регуляції, гени ферментів нематод, які розщеплюють клітинну стінку коренів рослин, гени секреторних білків езофагеальних залоз (експресія яких необхідна для проникнення стилету нематод у спеціалізовані клітини коренів – сайти харчування); гени репродуктивного циклу (мажорних білків сперми), гени хітинсинтетази (за участі якої утворюється міцний хітиновий покрив на оболонці яєць нематод) [9–15].

Створюються також генетичні конструкції з векторами експресії si/miРНК для сайленсингу генів рослин-господарів, які гіперекспресуються у період інфікування рослин і тим самим сприяють проникненню у корені та розмноженню паразитичних нематод. До найбільш важливих належать родини генів: PRP білків (Pathogenesis-related protein), білка – транспортера ауксину PIN2 (EIR), білків етиленреспонсивних (ERF) факторів, ряду транскрипційних факторів (AP2, MADS-box, bZIP, bHLH та NAC гени), гіберелін-регуляторних білків, збагачених проліном екстенсинподібних білків, білків – транспортерів нітратів NTP2, а також генів пектинестерази, феритину, цитохрому P450, халконсинтетази, генів білків метаболізму клітинної стінки та ін. [16, 17].

Раніше нами клоновано ген 8H07, що кодує один з важливих секреторних білків езофагеальних залоз паразитичної нематоди *H. schachtii*, а також проведено ПЛР ампліфікацію консервативної ділянки цього гена. За допомогою Нозерн-блот гібридизації підтверджено високий рівень гомології між його послідовностями та послідовностями антинематодних (антисенсових до CR-ділянки гена) малих регуляторних si/miРНК, виділених з рослин ріпака (*Brassica rapa* ssp. *oleifera*), котрі вирощували на інфекційному фоні та обробляли регулятором росту Регоплант [18]. Тому метою цієї роботи було створення векторних конструкцій з конститутивною експресією si/miРНК,

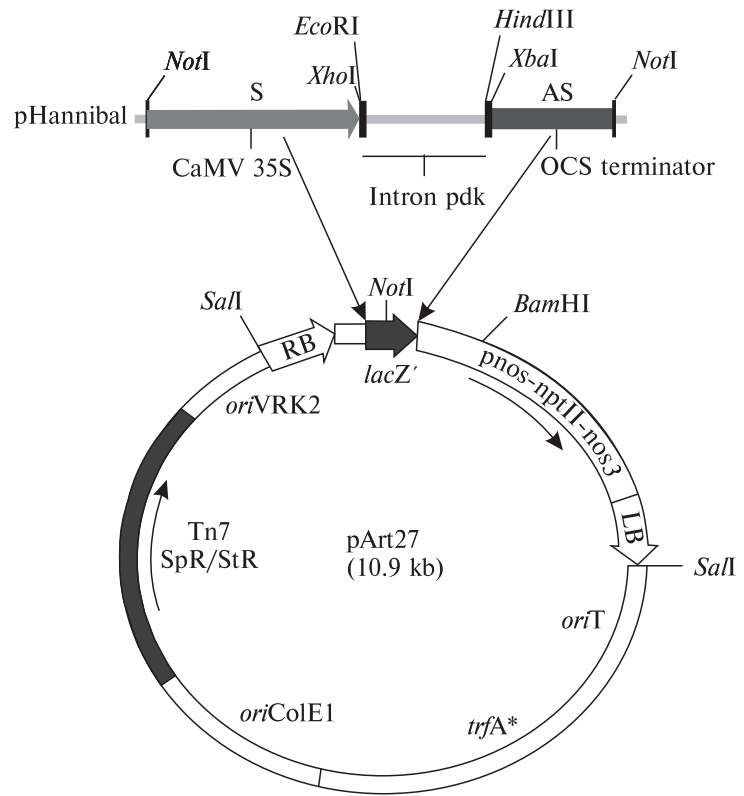


Рис. 1. Схема розміщення ампліфікованих за допомогою ПЛР кДНК інвертованих послідовностей фрагмента консервативної ділянки гена 8H07 нематоди *H. schachtii* під контролем 35S промотора у вектор pNannibal з наступним переключенням у сайт *NotI* бінарного вектора pArt27: S – сенсові послідовності, що містять сайти рестрикції *XhoI*–*EcoRI*; AS – антисенсові фрагменти, що містять сайти рестрикції *HindIII*–*XbaI*

специфічних до консервативної ділянки гена 8H07 паразитичної нематоди *H. schachtii*, та одержання трансгенних рослин ріпака з підвищеною стійкістю до шкідника.

Матеріали та методи. Векторні конструкції для РНК-інтерференції. Для досягнення ефекту РНК-інтерференції по відношенню до консервативної ділянки гена 8H07 нематоди *H. schachtii* створили конструкції з використанням вектора pNannibal [10, 19], який потім переключували у *NotI* сайт бінарного вектора pArt27 [20] (рис. 1). Рестрикцію, лігування ДНК, приготування плазмідної ДНК виконували згідно з рекомендаціями [21, 22].

Бінарний вектор за допомогою стандартного теплового шоку вносили у штам *Agrobacterium tumefaciens* C58, який у подальшому культивували на поживному середовищі LB, що містило 25 мг/мл канаміцину [22]. Перевірку штаму *A. tumefaciens* C58 на присутність плазмиди pArt27 здійснювали лужним виділенням плазмиди з наступним фракціонуванням за допомогою електрофорезу в 0,8%-ному агарозному гелі (рис. 2) [22].

Одержання трансгенних РНК-інтерферованих рослин ріпака та перевірка їхньої стійкості до нематоди *H. schachtii*. Рослини ріпака вирощували до стадії цвітіння в умовах теплиці на стерильному ґрунті при 24/20 °С (день–ніч). Першопочаткові бруньки зрізали для зняття апікального домінування та синхронізованої появи багаторазових вторинних бруньок. Трансформацію здійснювали за допомогою глибинного флорального методу (на стадії цвітіння рослини найбільш сприйнятливі до трансформації) шляхом занурення розвинутих флоральних тканин у розчин, який містив *A. tumefaciens*, 5 % цукрози та 0,05%-ний розчин (500 мкл/л) сурфактанта Silwet L-77 (для підвищення ефективності трансформації) [23]. Обробку квіток ріпака *A. tumefaciens* проводили

Рис. 2. Фрагменти плазмиди pArt27, фракціоновані за допомогою електрофорезу в 0,8%-ному агарозному гелі



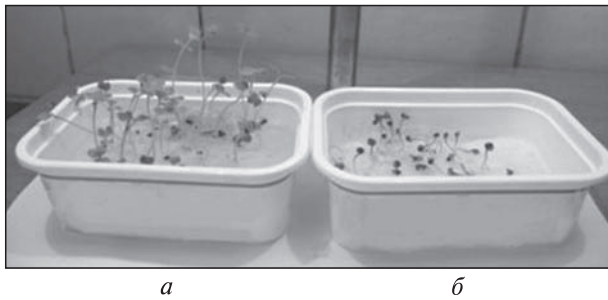


Рис. 3. Вирощені у лабораторних умовах на фоні інфекції *H. schachtii* 7-добові проростки ріпака, що одержані з насіння контрольних (б) та трансгенних (а) рослин

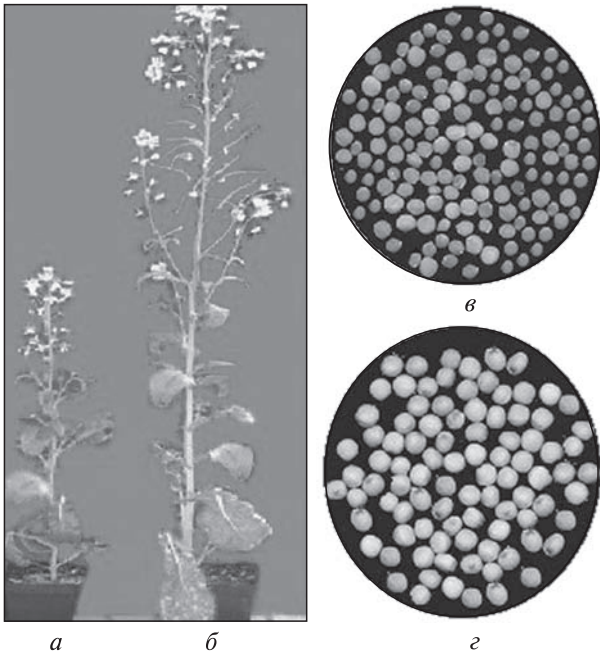


Рис. 4. Загальний вигляд контрольних і трансгенних рослин ріпака, вирощених на штучному інфекційному фоні (у присутності личинок нематоди *H. schachtii*), та їхнього насіння: а – контрольні рослини; б – дослідні рослини, трансформовані *A. tumefaciens*, з вектором експресії dsРНК, що є специфічними до консервативної ділянки гена 8N07 паразитичної нематоди *H. schachtii*; в – насіння контрольних рослин; г – насіння трансгенних рослин

декілька разів та накривали їх поліетиленовим чохлаком, щоб зберегти вологість. Після трансформації рослини переносили у темний бокс на 24 год, потім виносили на розсіяне світло та вирощували протягом вегетаційного періоду.

Насіння, отримане з трансгенних рослин, 1 хв стерилізували 96%-ним етанолом та 20 хв у 30%-ному водному розчині комерційного препарату «Білизна» з додаванням 0,02 % Tween, після чого промивали стерильною дистильованою водою. Насіння пророщували впродовж 7–10 діб в чашках Петрі у водному розчині канаміцину (20 мг/л) на інфекційному фоні (із суспензією цист нематоди *H. schachtii*, з яких у процесі інкубації при 23 °С приблизно на 5–7-му добу з'являлись личинки нематод) [24]. Ідентифікацію трансформованих рослин здійснювали за наявності у них 3–5 сформованих зелених листків та добре розвинутих коренів.

Стійкість 7-добових проростків трансгенних рослин ріпака до паразитичних нематод визначали за морфологічними ознаками у порівнянні з контрольними інфікованими рослинами (рис. 3).

Корені ріпака для підрахунку кількості паразитуючих на них личинок спочатку акуратно промивали у проточній воді, потім занурювали у розчин молочної кислоти, гліцерину, аніліну та дистильованої води на декілька хвилин, підігрівали 2 хв у мікрохвильовій печі та висушували на повітрі. Шматочки коренів довжиною 1,5 см поміщали у гомогенізатор. Після цього гомогенізовані корені переносили у циліндри об'ємом 150 мл з 100 мл води, ретельно струшували та підраховували кількість нематод, що проникли у корені [24]. Дорослі вегетуючі рослини пересаджували у стерильний ґрунт в горщики (рис. 4).

Молекулярно-біологічний аналіз генетично модифікованих рослин. Виділення сумарних препаратів РНК з клітин трансгенних рослин та паразитуючих на них личинок нематод *H. schachtii* проводили згідно з методом [18]. Полімерність виділених сумарних препаратів РНК аналізували за допомогою електрофорезу в 1,5%-ному агарозному гелі у присутності 7 М сечовини (гелі забарвлювали розчином бромистого етидію).

Наявність у геномі трансгенних рослин вектора експресії рArt27 за присутності інтрону піруватортофосфатдікіназа (pdk) [19] перевіряли методом ЗТ-ПЛР ампліфікації кДНК послідовностей інтрону pdk з використанням специфічних до цих послідовностей праймерів

(таблиця) на матриці сумарної мРНК, виділеної з трансгенних рослин ріпака [18]. Ампліфікований фрагмент фракціонували за допомогою електрофорезу в 15%-ному ПААГ, просоченому бромистим етидієм (рис. 5).

Аналіз експресії антинематодних si/miRNA в трансформованих рослинах ріпака здійснювали методом Нозерн-блот гібридизації сенсових та антисенсових si/miРНК послідовностей, отриманих із сумарної мРНК рослин, з радіоактивно міченими низькомолекулярними антисенсовими та сенсовими [α - 32 P]-міченими РНК-зондами [21] (рис. 6).

Спочатку виділяли si/miРНК за рекомендаціями Hamilton et al. [25], згідно з якими охолоджений у рідкому азоті та подрібнений рослинний матеріал для екстракції вносили у буфер: 50 мМ Трис-НСІ (рН 9), 10 мМ ЕДТА, 100 мМ хлориду натрію, 2 % ДДС (5 мл/1 г рослинного матеріалу). Після екстракції з метою видалення білків та полісахаридів гомогенат обробляли рівними об'ємами буфера, насиченого фенолом-хлороформом; нуклеїнові кислоти осаджували за допомогою розчину, який містив 1/10 об'єму 3 М ацетату натрію (рН 5,0) та три об'єми абсолютного етанолу.

Після інкубації впродовж 2 год при -20°C преципітат центрифугували, промивали 70%-ним етанолом, висушували та повторно розчиняли у бідистильованій воді. Високомолекулярні нуклеїнові кислоти осаджували з цього розчину додаванням поліетиленгліколю (молекулярна маса 8000) та хлориду натрію до кінцевих концентрацій 5 % і 500 мМ відповідно з наступною інкубацією на льоду впродовж 30 хв. Після видалення осаду центрифугуванням низькомолекулярні si/miРНК, що залишились у супернатанті, преципітували за допомогою ацетату натрію та етанолу, як описано вище; 50 мкг цієї фракції, що містила si/miРНК, фракціонували електрофорезом в 15%-ному ПААГ у присутності 7 М сечовини.

Сенсові та антисенсові РНК-зонди синтезовані за допомогою Riboprobe in vitro Transcription System (Promega) [21] із використанням рибонуклеотидів АТФ, ГТФ, ЦТФ та радіоактивно міченого [α - 32 P] УТФ (125 мкКі на 20 мкл реакційної суміші, специфічною активністю 3000 Кі/ммоль), а також Т7 РНК-полі-

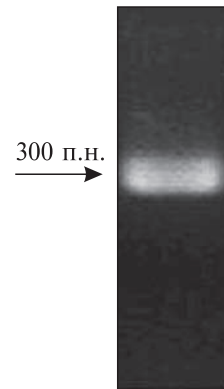


Рис. 5. Результати ідентифікації послідовності інтрону *pdk*, ампліфікованого за допомогою ЗТ-ПЛР, у 15%-ному ПААГ

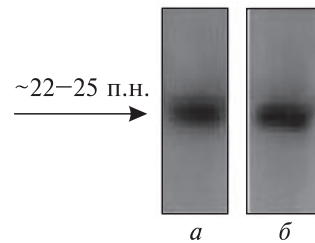


Рис. 6. Результати аналізу експресії si/miРНК, специфічних до консервативної ділянки гена 8H07 нематоди *H. schachtii*, у трансформованих рослинах ріпака методом Нозерн-блот гібридизації сенсових та антисенсових si/miРНК послідовностей, отриманих із сумарної мРНК рослин, з [α - 32 P]-міченими антисенсовими (а) та сенсовими (б) РНК-зондами

мерази на ДНК-матриці ліанеризованої плазмиди *pArt27*, денатурованої при $+80^{\circ}\text{C}$ [26]. Після проведення реакції транскрипції зонди обробляли 20 хв ДНКазою I при 37°C для видалення ДНК. Щоб отримати низькомолекулярні зонди (розміром 25–50 н.п.), що є специфічними до виділених si/miРНК [27], проводили послідуєчий лужний гідроліз повнорозмірних [α - 32 P]-мічених РНК зондів при 60°C протягом 2,5 год з використанням 300 мкл карбонатного буфера, котрий містив 120 мМ Na_2CO_3 /80 мМ NaHCO_3 на 20 мкл реакційної суміші [25, 27]. Після гідролізу послідовно проводили нейтралізацію розчину до рН 5,0, використовуючи 20 мкл 3 М ацетату натрію. Низькомолекулярні РНК у подальшому преципітували за допомогою 0,1 об'єму 3 М ацетату натрію, рН 5,2, 2 мкл розчину (10 мг/мл)

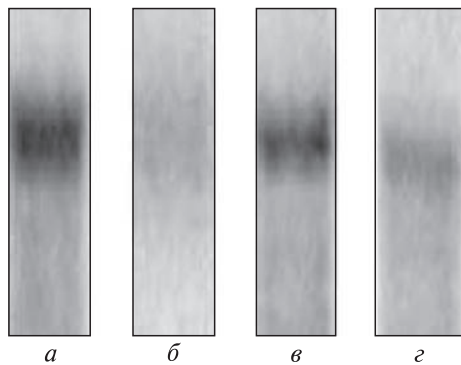


Рис. 7. Результати Нозерн-блот аналізу рівнів експресії консервативної ділянки гена 8H07: *а* – в клітинах личинок нематода *H. schachtii* з коренів контрольних рослин; *б* – в клітинах личинок нематод *H. schachtii* з коренів трансгенних рослин ріпака; в клітинах контрольних (*в*) та трансгенних рослин ріпака (*г*), вирощених впродовж вегетаційного періоду на інфекційному фоні

глікогену та двох об'ємів 96%-ного етанолу при -20°C протягом 30 хв. Потім здійснювали промивання 80%-ним етанолом, висушування та розчинення у 30 мкл вільної від нуклеаз дистильованій воді з наступною денатурацією їх при $+80^{\circ}\text{C}$ впродовж 5 хв.

З гелю si/miРНК переносили на нейлонову мембрану Zeta-Probe за допомогою електроблотингу (при 300 мА протягом 1 год) і проводили Нозерн-блот гібридизацію сенсових та антисенсових послідовностей si/miРНК з відповідно антисенсовими та сенсовими $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -міченими низькомолекулярними РНК-зондами (впродовж 24 год при 42°C) у буфері, що містив 125 мМ фосфату натрію, рН 7,2, 250 мМ хлориду натрію, 7 % ДДС, 50 % деіонізованого формаміду з наступною дворазовою промивкою розчином $2\times\text{SSC}$ ($1\times\text{SSC} = 150$ мМ хлориду натрію та 15 мМ цитрату натрію, рН 7,0) і 0,2 % ДДС протягом 30 хв при 42°C . Негібридизовані (неспецифічні) ділянки видаляли шляхом інкубації мембран впродовж 1 год при 37°C у буфері, що містив 20 мМ Трис-НСІ, рН 7,5, 5 мМ ЕДТА, 60 мМ хлориду натрію, 10 мкг/мл РНКазі А. Після цього мембрани промивали 1 год розчином $2\times\text{SSC}$ і 96° етиловим спиртом та експонували з рентгенівською плівкою протягом 72 год [21, 22, 25, 27].

Визначення змін рівня експресії консервативної ділянки гена 8H07 нематода *H. schach-*

tii (ефективності сайленсингу) у клітинах контрольних личинок нематод та паразитуючих на коренях трансгенних рослин ріпака нематод перевіряли за допомогою Нозерн-блот гібридизації сумарної мРНК нематод, попередньо фракціонованої електрофорезом в 15%-ному ПААГ у присутності 7 М сечовини [18], з антисенсовими до консервативної ділянки гена 8H07 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -дЦТФ кДНК-зондами (рис. 7) [21, 22, 28]. З цією метою сумарний препарат РНК з клітин нематод розділяли на полі(A)⁺мРНК (тобто мРНК) та полі(A)⁻мРНК на оліго(dT)-целюлозній колонці, синтезували кДНК на матрицях полі(A)⁺РНК за допомогою зворотної транскриптази і $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -міченого дЦТФ та проводили ПЛР ампліфікацію кДНК послідовностей консервативної ділянки гена 8H07 з використанням праймерів (5'-ACAACGTCAGCAACAACAGAATCAGG-3'; R5'-CTTCCTCGCCATTCATCATCT-TGCTC-3'), специфічних до послідовностей гена, розташованих за межами ділянок, які є мішенями для RNAi-інтерференції, дезоксиолігонуклеотидів дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ та радіоактивно міченого $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ дЦТФ (~10 мкКі/мкл) з наступним фракціонуванням ампліфікованої кДНК у 15%-ному ПААГ з 7 М сечовиною. Гібридизацію сумарної мРНК нематод з антисенсовими $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -міченими кДНК зондами здійснювали на нейлонових мембранах Zeta-Probe протягом 24 год при 42°C (умови гібридизації та склад гібридизаційного буфера аналогічні зазначеним вище).

Визначення змін рівня експресії консервативної ділянки гена 8H07 трансгенних рослин ріпака (ефективності самосайленсингу) проводили за допомогою Нозерн-блот гібридизації сенсових послідовностей сумарної мРНК рослин з антисенсовими $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -міченими кДНК-зондами, отриманими ампліфікацією кДНК послідовностей CR ділянки гена 8H07 рослин із використанням дезоксиолігонуклеотидів дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ та радіоактивно міченого $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -дЦТФ (~10 мкКі/мкл), а також специфічних до цього гена праймерів (5'-TTATATCGATATGTCCGAGTCAAACAAG-3', R5'-TTATATCGATCTAGAAAAAATTAGGGTTG-3') з наступним фракціонуванням ампліфікованої кДНК у 15%-ному ПААГ з 7 М сечовиною (умови гібридизації та склад гібри-

дизайнічного буфера аналогічні зазначеним вище) [21, 22, 28].

Результати досліджень та їх обговорення. Відомо, що необхідною умовою для досягнення ефективного посттранскрипційного сайленсингу генів є забезпечення високого та стабільного рівня експресії гетерологічних генів у трансгенних рослинах [29–32]. З цією метою нами обрано вектор рHannibal [19] (рис. 1). Ампліфіковані за допомогою ПЛР кДНК послідовності фрагмента консервативної ділянки гена 8Н07 нематоди *H. schachtii* розміщували під контролем конститутивного 35S промотора і термінатора OCS (ділянка термінації транскрипції гена октопінсинтети) як сенсові (S) (які містять сайти рестрикції *XhoI*–*EcoRI*) та інвертовані антисенсові (AS) фрагменти (що містять сайти рестрикції *HindIII*–*XbaI*) у вектор рHannibal. Важлива особливість цього вектора – присутність в ньому сенсових та інвертованих антисенсових послідовностей, що є матрицями для синтезу dsРНК молекул за участі RdRP-полімерази (РНК-залежної РНК-полімерази). Це дає можливість уникнути небажаної антисенсової супресії або косупресії, яка трапляється у випадку трансформації векторами, що містять тільки одну сенсову чи антисенсову послідовність [19]. Крім того, присутність у вектора рHannibal між сенсовими та антисенсовими послідовностями інтрону *rdk* як спейсера дозволяє посилити рівень експресії гетерологічного гена та покращити ефективність сайленсингу до 100 % порівняно з векторами без інтронів (48–58 %) та векторами, що містять тільки антисенсові послідовності (12 %) [29–31]. Цей феномен можна пояснити зростанням рівня транскрипції антисенсових dsРНК на матриці інсерційних послідовностей *si/miРНК*, стабільності *si/miРНК* у процесах сплайсингу та експорту з ядра в цитоплазму. Надалі вектор рHannibal переклонували у сайт *NotI* бінарного вектора рArt27 (рис. 1).

Обраний нами бінарний вектор рArt27 [20] теж має ряд переваг: він містить Ri- та Ti-реплікони (порівняно з іншими бінарними векторами, які мають лише один Ri-плазмідний мініреплікон, що дозволяє інсерціювати його як у штами *A. rhizogenes*, так і *A. tumefaciens*), мінімальний реплікон RK2 для реплікації в *Escherichia coli* та *Agrobacterium* [33], а також

ділянку ColE1 для висококопійної реплікації в *E. coli*. Завдяки присутності бактеріальних селективних маркерів – генів стійкості до спектиноміцину/стрептоміцину Tn7 (отриманих з бінарного вектора рMON530) [34] та химерного гена стійкості до канаміцину (отриманого з вектора рGA643) [35, 36] для селекції трансгенних рослин можуть використовуватись середовища з додаванням або 100 мг/мл спектиноміцину, або 25 мг/мл стрептоміцину, або 20 мг/мл альтернативного селективного маркера – канаміцину.

Унікальна організаційна структура вектора рArt27, що містить праворуч від 3'-кінця Т-ДНК ділянку *lacZ'* з енхансерним елементом [37], за яким слідує химерний селективний маркер стійкості до канаміцину (розташований між промотором гена нопалінсинтети та термінатором фосфотрансферазо-нопалінсинтети), а ліворуч від 3'-кінця Т-ДНК – граничний фрагмент, який дозволяє уникнути зниження частоти випадкової термінації трансформації, що часто спостерігається при використанні векторів з іншими конструкціями [20, 35].

Від лівограничної ділянки Т-ДНК праворуч розташовано отриманий з бінарного вектора рGEM5Zf' модифікований (з делецією сайтів *SaI*–*NdeI*) фрагмент *lacZ'* [20], який містить маркерний ген β-галактозидази, що дозволяє проводити гістохімічний скринінг у рекомбінантів рArt27 на середовищах з 5-бром-4-хлор-3-індоліл-β-D-галактозидазою. З метою полегшення клонування послідовностей експресії вектора рHannibal в ділянці *lacZ'* було розміщено унікальний сайт *NotI* [20].

Отриманий агробактеріальний штам *A. tumefaciens* C58 перевіряли на присутність плазміди рArt27 лужним виділенням плазміди з наступним фракціонуванням на лінійні та кільцеві молекули за допомогою електрофорезу в 0,8%-ному агарозному гелі [22] (рис. 2).

Трансформацію рослин ріпака вектором експресії антинематодних dsРНК, специфічних до консервативної ділянки гена 8Н07 нематоди *H. schachtii*, проводили флоральним глибинним методом на стадії цвітіння. Крім того, що застосування цього методу не потребує використання культури клітин та тканин *in vitro* для регенерації трансформантів, ще одна перевага його полягає у тому, що потомство

отриманих рослин є генетично однорідним (тобто гомозиготним за трансгенним локусом) і позбавлене соматоклональних варіацій, які виникають у культурі тканин *in vitro* [23].

На рис. 3 представлено 7-добові проростки ріпака, вирощені на інфекційному фоні (у присутності личинок нематода *H. schachtii*) з насіння контрольних та трансформованих рослин. Очевидно, що виражена різниця у морфологічних ознаках між контрольними (б) та дослідними (а) трансгенними рослинами пояснюється підвищеною стійкістю одержаних нами трансгенних рослин ріпака до нематода *H. schachtii*. Встановлено, що кількість личинок цієї нематода, що паразитують на коренях трансгенних рослин ріпака, значно зменшується (до 80 %) відносно контрольних рослин. На рис. 4 продемонстровано різницю морфологічних ознак контрольних (а) та трансгенних (б) рослин ріпака, вирощених у лабораторних умовах на інфекційному фоні, та насіння (в і з), отриманого з цих рослин.

За допомогою ЗТ-ПЛР ампліфікації послідовностей інтрону *rdk* з використанням специфічних до цих послідовностей праймерів (таблиця) на матриці сумарної мРНК (через кДНК), виділеної з трансгенних рослин ріпака, із наступним фракціонуванням ампліфікованої ділянки електрофорезом у 15%-ному ПААГ, просоченому бромистим етидієм, перевірили наявність у геномі трансгенних рос-

лин вектора експресії *pArt27* (рис. 5). Розмір ампліфікованих нами послідовностей інтрону *rdk* становив 300 п.н., що узгоджується з даними літератури [19].

Методом Нозерн-блот гібридизації сенсових та антисенсових послідовностей *si/mi*РНК, отриманих із сумарної мРНК трансформованих рослин ріпака, з [α - 32 P]-міченими антисенсовими (рис. 6, а) та сенсовими (рис. 6, б) низькомолекулярними РНК-зондами, отриманими *in vitro* за допомогою транскрипції на ДНК-матриці ліанеризованої *pArt27* плазмиди [21, 22, 25, 27], підтвердили наявність високого рівня експресії антинематодних *si/mi*РНК в трансформованих рослинах ріпака.

При перевірці ефективності сайленсингу антинематодними *si/mi*РНК, специфічними до консервативної ділянки гена 8H07, у клітинах личинок нематода *H. schachtii*, що паразитують на коренях трансгенних рослин ріпака, методом Нозерн-блот гібридизації сумарної мРНК нематод (попередньо фракціонованої у 15%-ному ПААГ з 7 М сечовиною) із антисенсовими [α - 32 P]-міченими кДНК зондами [11, 21, 28] встановлено різке зниження рівня експресії (~90 %) консервативної ділянки гена 8H07 (рис. 7, б) порівняно з високим рівнем експресії цього гена у клітинах личинок нематод, вилучених з коренів контрольних рослин (рис. 7, а).

Менш виражене зниження рівня експресії (~60 %) консервативної ділянки гена 8H07 спостерігалось також в клітинах трансгенних рослин ріпака, вирощених впродовж вегетаційного періоду на інфекційному фоні у присутності личинок нематода *H. schachtii* (рис. 7, з), порівняно з контрольними рослинами (рис. 7, в). Різницю між рівнями експресії генів 8H07 у нематод та рослин можливо пояснити наявністю у консервативній ділянці цього гена значної кількості нуклеотидних послідовностей, що відрізняються [15, 18].

Згідно з даними літератури [11, 15] ступінь гомології між CR-ділянками гена 8H07 у рослин та нематод становить ~40 %, хоча продуктами експресії гена 8H07 у нематод і рослин є ідентичні білки SKP1 [15, 38–40] – компоненти SCF-комплексу протеолітичних ферментів (протеасоми). За участі цього комплексу відбувається процес поліубіквітинуювання та деградації білків.

Перелік послідовностей праймерів, використаних для ампліфікації послідовностей інтрону *rdk*

Праймер	Послідовності	Кількість пар нуклеотидів, отриманих в результаті ПЛР
PDK-RT-R	5'-ATCAATGATAACA-CAATGACATGATCT-3'	300
pIntronF	5'-GACGAAGAAGAT-AAAAGTTGAGAG-3'	
pIntronR	5'-TTGATAAATTACA-AGCAGATTGGA-3'	

Примітка. R – зворотні, F – прямі послідовності; RT-R – зворотні послідовності для синтезу одноланцюгової кДНК матриці.

Встановлено, що нематодний ген 8H07, крім ділянки CR, має унікальну ділянку UR, специфічну тільки для нематод. Отримано також дані, які свідчать, що конституційна експресія гена 8H07 у рослинах-господарях сприяє їхній гіперчутливості до нематодної інфекції (тобто ураженню рослин нематодами). В організмі нематод під експресії гена 8H07 спостерігається в період проникнення їх до спеціалізованих клітин коренів рослин – сайтів харчування [11, 15, 18]. Тому створення векторних конструкцій з конститутивною експресією антисенсових dsРНК для сайленсингування гена 8H07 як у рослин, так і у фітонематод є ефективною стратегією для підвищення у рослин стійкості до нематодної інвазії.

Висновки. В ході проведених досліджень нами вперше клоновано та сконструйовано вектор з конститутивною експресією dsРНК, комплементарних ампліфікованому фрагменту кДНК консервативної ділянки гена 8H07 нематоди *H. schachtii*, та проведено генетичну трансформацію ріпака за допомогою агробактерії *A. tumefaciens*. Методом ЗТ-ПЛР проаналізовано сумарну мРНК, виділену з генетично модифікованих рослин ріпака, на наявність у геномі трансгенних рослин вектора експресії рArt27 за присутності інтрону рdk. Із застосуванням Нозерн-блот гібридизації сумарної мРНК рослин з [P³²]-міченими сенсовими та антисенсовими низькомолекулярними РНК-зондами перевірено наявність експресії антинематодних si/miРНК у трансгенних рослинах ріпака. Аналогічно за допомогою Нозерн-блот гібридизації сумарної мРНК нематод та сумарної мРНК рослин з [P³²]-міченими кДНК зондами, антисенсовими до CR-ділянки гена 8H07, підтверджено високий рівень сайленсингової активності si/miРНК, які експресуються в трансгенних рослинах, специфічних до консервативної ділянки гена 8H07. Завдяки цьому відбувається блокування трансляції (сайленсинг) як мРНК рослин (внаслідок чого підвищується їх стійкість до шкідників), так і мРНК нематод, чим і пояснюється значне зменшення їхньої кількості (до 80 % відносно контролю). В лабораторних умовах за фізіологічними показниками підтверджено значне підвищення стійкості трансгенних рослин ріпака до коренепаразитуючої нематоди *H. schachtii*.

V.A. Tsygankova, A.I. Yemets, H.O. Iutinska,
L.O. Beljavska, A.P. Galkin, Ya.B. Blume

Institute of Bioorganic Chemistry & Petrochemistry,
Natl. Acad. of Sci. of Ukraine, Kyiv
E-mail: vTsygankova@ukr.net
Institute of Food Biotechnology and Genomics,
Natl. Acad. of Sci. of Ukraine, Kyiv
Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
Natl. Acad. of Sci. of Ukraine, Kyiv

INCREASING OF RAPE PLANT RESISTANCE TO PARASITIC NEMATODE *HETERODERA SCHACHTII* USING RNAi-TECHNOLOGY

A vector for constitutive expression of antisense to the conservative region 8H07 gene of nematode *H. schachtii* dsRNA is constructed and genetic transformation of rape plants is conducted by means of *A. tumefaciens*. Using molecular-genetic methods the presence of vector expression antinematode dsRNA in the genome of transgenic rape plants is shown. A high level of their silencing activity is confirmed both in nematodes and in infected plants. In laboratory studies for the physiological indexes the considerable increase of resistance was shown of transgene rape plants to root parasitic nematode *H. schachtii*.

V.A. Цыганкова, А.И. Емец, Г.А. Иутинская,
Л.А. Белявская, А.П. Галкин, Я.Б. Блюм

ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ РАПСА К ПАЗАРИТИЧЕСКОЙ НЕМАТОДЕ *HETERODERA SCHACHTII* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИЙ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

Сконструирован вектор для конститутивной экспрессии антисмысловых к консервативной области гена 8H07 нематоды *H. schachtii* dsРНК и проведена генетическая трансформация растений рапса с использованием *A. tumefaciens*. С помощью молекулярно-генетических методов показано присутствие в геноме трансгенных растений рапса вектора экспрессии антинематодных dsРНК, а также подтвержден высокий уровень их сайленсинговой активности как в организме нематод, так и у инфицированных ими растений. В лабораторных опытах по физиологическим показателям показано значительное повышение устойчивости трансгенных растений рапса к коренепаразитурующей нематоды *H. schachtii*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Chitwood D.J. Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service // Pest Manag. Sci. – 2003. – 59. – P. 748–753.
2. Karczmarek A., Overmars H., Helder J., Goverse A. Feeding cell development by cyst and root-knot nematodes involves a similar early, local and tran-

- sient activation of a specific auxin-inducible promoter element // *Mol. Plant Path.* – 2004. – **5**, № 4. – P. 343–346.
3. Fuller V.L., Lilley C.J., Urwin P.E. Nematode resistance // *New Phytol.* – 2008. – **180**. – P. 27–44.
 4. Oka Y. Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments // *Appl. Soil Ecol.* – 2010. – **44**. – P. 101–115.
 5. Іутинська Г.А., Валагурова Е.В., Козырицкая В.Е., Белявская Л.А., Петрук Т.В., Пономаренко С.П., Икин Д. Аверком – новый антипаразитарный препарат // Биорегуляция микробно-растительных систем / Под ред. Г.А. Иутинской, С.П. Пономаренко. – К.: Нічлава, 2010. – С. 276–396.
 6. Циганкова В.А., Пономаренко С.П., Блюм Я.Б. Молекулярно-генетичні механізми дії регуляторів росту рослин з біозахисними властивостями // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. – 2012. – **10**, № 1. – С. 86–94.
 7. Yu H., Kumar P.P. Post-transcriptional gene silencing in plants by RNA // *Plant Cell Rep.* – 2003. – **22**. – P. 167–174.
 8. Padmanabhan Ch., Zhang X., Jin H. Host small RNAs are big contributors to plant innate immunity // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2009. – **12**. – P. 465–472.
 9. Gheysen G., Vanholme B. RNAi from plants to nematodes // *Trends Biotechnol.* – 2006. – **25**, № 3. – P. 89–92.
 10. Fairbairn D.J., Cavallaro A.S., Bernard M. et al. Host-delivered RNAi: an effective strategy to silence genes in plant parasitic nematodes // *Planta.* – 2007. – **226**. – P. 1525–1533.
 11. Gao B., Allen R., Maier T. et al. Identification of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 2001. – **14**, № 10. – P. 1247–1254.
 12. Elling A.A., Davis E.L., Hussey R.S., Baum T.J. Active uptake of cyst nematode parasitism proteins into the plant cell nucleus // *Int. J. Parasit.* – 2007. – **37**. – P. 1269–1279.
 13. Veronico P., Gray L.J., Jones J.T. et al. Nematode chitin synthases: gene structure, expression and function in *Caenorhabditis elegans* and the plant parasitic nematode *Meloidogyne artiellia* // *Mol. Genet. Genom.* – 2001. – **266**. – P. 28–34.
 14. Rosso M.N., Dubrana M.P., Cimbolini N. et al. Application of RNA interference to root-knot nematode genes encoding esophageal gland proteins // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 2005. – **18**, № 7. – P. 615–620.
 15. Sindhu A.S., Maier T.R., Mitchum M.G. et al. Effective and specific in planta RNAi in cyst nematodes: expression interference of four parasitism genes reduces parasitic success // *J. Exp. Bot.* – 2009. – **60**, № 1. – P. 315–324.
 16. Ithal N., Recknor J., Nettleton D. et al. Parallel genome-wide expression profiling of host and pathogen during soybean cyst Nematode infection of soybean // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 2007. – **20**, № 3. – P. 293–305.
 17. Jammes F., Lecomte F., Almeida-Engler J. et al. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis* // *Plant J.* – 2005. – **44**. – P. 447–458.
 18. Tsygankova V.A., Andrusevich Ya.V., Ponomarenko S.P., Galkin A.P., Blume Ya.B. Isolation and amplification of cDNA from the conserved region of the nematode *Heterodera schachtii* 8H07 gene with a close similarity to its homolog in rape plants // *Cytology and Genetics.* – 2012. – **46**, № 6. – P. 335–341.
 19. Wesley S.V., Helliwell C.A., Smith N.A. et al. Construct design for efficient, effective and high throughput gene silencing in plants // *Plant J.* – 2001. – **27**, № 6. – P. 581–590.
 20. Gleave A.P. A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome // *Plant Mol. Biol.* – 1992. – **20**. – P. 1203–1207.
 21. *Promega Protocols and Applications Guide*. 2nd ed. – USA : Promega Corporation, 1991. – 422 p.
 22. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. – New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – 480 p.
 23. Steven J., Clough S.T., Bent A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* – 1998. – **16**, № 6. – P.735–743.
 24. Циганкова В.А., Стефановська Т.Р., Андрусевич Я.В., Пономаренко С.П., Галкін А.П., Блюм Я.Б. Індукція регуляторами росту біосинтезу si/miРНК з антипатогенними та антипаразитарними властивостями в клітинах рослин // Біотехнологія. – 2012. – **5**, № 3. – С. 62–74.
 25. Hamilton A.J., Baulcombe D.C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants // *Science.* – 1999. – **286**. – P. 950–952.
 26. Wang M.B., Wesley S.V., Finnegan E.J. et al. Replicating satellite RNA induces sequence-specific DNA methylation and truncated transcripts in plants // *RNA.* – 2001. – **7**. – P. 16–28.
 27. Mette M.F., Aufsatz W., Winden J. et al. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA // *EMBO J.* – 2000. – **19**, № 19. – P. 5194–5201.
 28. Lim H.-S., Ko T.-S., Lambert K.N. et al. Soybean mosaic virus helper component-protease enhances somatic embryo production and stabilizes transgene expression in soybean // *Plant Physiol. Biochem.* – 2005. – **43**. – P. 1014–1021.
 29. Wang M.B., Upadhyaya N.M., Brettell R.I.S., Waterhouse P.M. Intron-mediated improvement of a selectable marker gene for plant transformation using *Agrobacterium tumefaciens* // *J. Genet. Breed.* – 1997. – **51**. – P. 325–334.

30. *Smith N.A., Singh S.P., Wang M.-B. et al.* Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs // *Nature*. – 2000. – **407**. – P. 319–320.
31. *Horiguchi G.* RNA silencing in plants: a shortcut to functional analysis // *Differentiation*. – 2004. – **72**. – P. 65–73.
32. *Kerschen A., Napoli C.A., Jorgensen R.A., Muller A.E.* Effectiveness of RNA interference in transgenic plants // *FEBS Lett.* – 2004. – **566**, № 1/3. – P. 223–228.
33. *Schmidhauser T.J., Helinski D.R.* Region of broad-host range plasmid RK2 involved in replication and stable maintenance in nine species of gram-negative bacteria // *J. Bacteriol.* – 1985. – **164**. – P. 446–455.
34. *Rogers S.G., Klee H.J., Horsch R.B., Fraley R.T.* Improved vectors for plant transformation : Expression cassette vectors and new selectable markers // *Meth. Enzymol.* – 1987. – **153**. – P. 253–277.
35. *Jen G.C., Chilton M.D.* The right border region of pTiT37 T-DNA is intrinsically more active than the left border region promoting T-DNA transformation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 1986. – **83**. – P. 3895–3899.
36. *An G., Ebert P.P., Mitra A., Ha S.B.* Binary vectors // *Plant Molecular Biology Manual* / Eds S.B. Gelvin, R.A. Schilperoort, D.P.S. Verma. – Dordrecht : Kluwer Acad. Publ., 1988. – P. A3/1-A3/19.
37. *Peralta E.G., Hellmiss R., Ream W.* Overdrive, a T-DNA transmission enhancer on the *A. tumefaciens* tumor-inducing plasmid // *EMBO J.* – 1986. – **5**. – P. 1137–1142.
38. *Drouaud J., Marrocco K., Ridet C. et al.* A *Brassica napus* skp1-like gene promoter drives GUS expression in *Arabidopsis thaliana* male and female gametophytes // *Sex. Plant Rep.* – 2000. – **13**. – P. 29–35.
39. *Zhao D., Ni W., Feng B. et al.* Members of the Arabidopsis-SKP1-like gene family exhibit a variety of expression patterns and may play diverse roles in Arabidopsis // *Plant Physiol.* – 2003. – **133**. – P. 203–217.
40. *Chai L., Biswas M.K., Ge X., Deng X.* Isolation, characterization, and expression analysis of an SKP1-like gene from ‘Shatian’ Pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 2010. – **28**. – P. 569–577.

Надійшла 08.06.12