

УДК: 631.811.98 75.117.2.577.2.08

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ ДІЇ РЕГУЛЯТОРІВ РОСТУ РОСЛИН З БІОЗАХИСНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ

В.А. ЦИГАНКОВА¹, С.П. ПОНОМАРЕНКО², Я.Б. БЛЮМ³

¹ Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України
Україна, м. Київ-94, МСП-660 02660, вул. Мурманська, 1
e-mail: vTsygankova@ukr.net

² Міжвідомчий науково-технологічний центр «Агробіотех» НАН і МОН України
Україна, 02160, м. Київ, Харківське шосе, 50

³ Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України
Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а
e-mail: cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net

Мета. Встановити молекулярно-генетичні механізми підвищення стійкості рослин цукрового буряку та ярої пшениці до патогенних організмів. **Методи.** Досліджували рослини цукрового буряку *Beta vulgaris* L., інфіковані цистоутворюючою коренепаразитуючою нематодою *Heterodera schachtii*, а також рослини пшениці, інфіковані патогенним мікроміцетом *Fusarium oxysporum graminearum*. За допомогою методу молекулярної гібридизації мРНК із si/miRNA перевіряли можливість індукції регуляторами росту рослин синтезу si/miRNA з антипатогенною активністю. Було застосовано метод дот-блот-гібридизації мРНК з si/miRNA. **Результати.** Вперше показано, що регулятори росту рослин підвищують стійкість рослин цукрового буряку до нематоди *Heterodera schachtii* і рослин ярої пшениці до патогенного мікроміцету *Fusarium oxysporum graminearum* шляхом стимуляції синтезу малих регуляторних si/miRNA. **Висновки.** Встановлені різниці в популяціях si/miRNA між контрольними рослинами цукрового буряку та ярої пшениці, і дослідними рослинами, які обробляли композиційними препаратами – регуляторами росту з біозахисними властивостями на штучно створеному нематодою *Heterodera schachtii*, а також патогенним мікроміцетом *Fusarium oxysporum graminearum* інфекційному фоні, що вказує на існування гнучкої системи перепрограмування геному клітин рослин під дією різних зовнішніх регуляторних факторів.

Ключові слова: регулятори росту рослин, малі регуляторні si/miRNA, стійкість рослин до патогенів.

Вступ. Упродовж останніх 15 років велика увага приділяється виділенню з клітин еукаріотів та визначенню біологічної ролі малих регуляторних РНК (small regulatory RNA) в RNAi (RNA interference) процесі, який прийнято називати пост-транскрипційний сайленсинг генів (PTGS) у рослин, тварин та грибів [1–7]. Сайленсинг генів – процес, у результаті якого відбувається або деградація, або блокування трансляції молекул-мішеней мРНК, має велике значення в адаптаційній резистентності до вірусів, у захисті геному від транспозицій мобільних ДНК елементів, а також в онтогенетичній регуляції експресії генів. Основну роль у сайленсингу виконують 2 типи малих регуляторних РНК: miRNA (microRNA) та siRNA (short interfering RNA) [1–6]. miRNA утворюються із мо-

© В.А. ЦИГАНКОВА, С.П. ПОНОМАРЕНКО, Я.Б. БЛЮМ, 2012

лекул-попередників шляхом двох раундів ендорибонуклеазного розщеплення за допомогою RNase-III подібних ферментів: спочатку за допомогою рибонуклеази RNase III Drosha утворюється pre-miRNA – первинний шпилько-подібний подовжений (~70 нн) транскрипт з одноланцюгових окремих геномних локусів. Ці молекули pre-miRNA експортуються в цитоплазму, де відбувається їх процесинг за допомогою ендорибонуклеази RNase III Dicer, в результаті чого утворюються зрілі одноланцюгові (довжиною ~21–22 нн) молекули miRNA, які інкорпуються в miRNPs (micro-ribonucleoproteins) [3, 4]. siRNA (розміром ~22–24 нн) утворюються з подовжених дволанцюгових попередників РНК – dsRNA (double-stranded RNA) в результаті їх розщеплення ендорибонуклеазою RNase III Dicer на короткі одноланцюгові (ss)siRNA (single-stranded siRNA) [1, 2, 5, 6]. Одна частина (ss)siRNA використовується для «сайленсінгування» молекул-мішеней мРНК, тоді як інші молекули (ss)siRNA функціонують як праймери до комплементарних послідовностей mRNA, на яких за допомогою полімерази RdRP (RNA-dependent RNA polymerase) утворюються нові молекули dsRNA. Припускають, що siRNA є похідними від подовжених послідовностей, що повторюються, транспозонів та трансгенів. Встановлено, що si/miRNA близькі за структурою і функцією (характеризуються антисенсовою комплементарною структурою до mRNA) і відіграють подвійну роль у рослин [1–15]: 1) разом із сайт-специфічними мульти-субодінічними ендо- та екзонуклеазами, які є складовими RISC комплексу (RNA-induced silencing complex), si/miRNA визначають період життя кожної з молекул мРНК, насамперед знищують шляхом або деградації (розщеплення), або блокування (сайленсінга) трансляції аберантні та недосконалі за структурою молекули mRNA, які можуть з'являтися помилково в кліти-

нах; 2) виконують захисні (антипатогенні та антипаразитичні) функції. В обох випадках ці біологічні ефекти досягаються шляхом зв'язування si/miRNA з комплементарною полінуклеотидною ланкою мРНК власних клітин, чи мРНК хворобоутворюючих вірусів, або mRNA паразитичних організмів, наприклад нематод. У клітинах тварин та рослин si/miRNA функціонують різними шляхами: si/miRNA тварин зв'язуються з 3'-UTR ділянками (3'-untranslated regions) або з ORF (open reading frame) молекул-мішеней мРНК, в той час як si/miRNA рослин зв'язуються з кодуючими послідовностями мРНК [16]. Але у випадках інфікування великої маси клітин у тканинах рослин шкідниками синтезується недостатньо молекул si/miRNA проти тих чи інших паразитів і тому, відповідно, не досягається захисний ефект. Вчені пропонують два підходи підвищення кількості si/miRNA у відповідь на патогенез [1, 5, 8–10]: за допомогою введення у клітини додаткової кількості копій генів si/miRNA шляхом генетичної трансформації; активацією експресії власних клітинних генів синтезу si/miRNA якимись специфічними індукторами.

До нових ефективних вітчизняних препаратів – індукторів імунізаційних властивостей рослин належать створені в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України разом із Державним підприємством «Міжвідомчим науково-технологічним центром «Агробіотех» НАН і МОН України композиційні поліфункціональні препарати Біоген, Стімпо та Регоплант, біозахисні властивості яких обумовлені синергійним ефектом взаємодії продуктів життєдіяльності в культурі *in vitro* гриба-міксоміцета, виділеного з кореневої системи женьшеню (суміш амінокислот, вуглеводів, жирних кислот, полісахаридів, фітогормонів та мікроелементів), та аверсектинів – комплексних антипаразитарних макролідних антибіотиків, продуктів мета-

болізму ґрунтового стрептоміцету *Streptomyces avermitilis* [17]. Стрептоміцети відомі як продуценти не лише антибіотиків, але й таких біологічно активних речовин, які виявляють фітозахисну і рістстимулювальну дію на рослини. Це – різного роду гормони, вітаміни, амінокислоти, каротиноїди, ферменти, токсини й інші речовини, що впливають на ростові процеси рослин, а саме стимулюють проростання насіння і підвищують врожайність [18, 19].

Як виявлено у проведених нами молекулярно-генетичних дослідженнях [20, 21], ці препарати значно підвищують стійкість рослин до різних патогенів завдяки стимуляції ними синтезу власно клітинних малих регуляторних РНК (small regulatory RNA), що беруть участь в RNAi (RNA interference) процесі, який прийнято називати посттранскрипційним сайленсингом генів (PTGS) у рослин, тварин та грибів [22 – 27]. Сайленсинг генів – процес, у результаті якого відбувається або деградація, або блокування трансляції молекул-мішеней мРНК, має велике значення в адаптаційній резистентності до вірусів, у захисті геному від транспозицій мобільних елементів ДНК, а також в онтогенетичній регуляції експресії генів. Основну роль у сайленсингу виконують малі регуляторні si/miРНК розміром 22–24 нм [22 – 27], що синтезуються з попередників – дволанцюгових dsRNA (double-stranded RNA) транскриптів шляхом ендонуклеазного розщеплення за допомогою РНКаз-III подібних ферментів. Разом із сайт-специфічними ендо- та екзонуклеазами si/miRNA або блокують (сайленсингують) трансляцію аберантних та недосконалих за структурою власно клітинних мРНК, а також мРНК патогенів та паразитів, або ферментативно розщеплюють ці молекули-мішені мРНК, що і призводить до їхньої деградації [22–27].

Метою нашої роботи було встановлення молекулярно-генетичних механізмів підвищення стійкості рослин цукрового бу-

ряку та ярої пшениці до патогенних організмів.

Матеріали і методи

У дослідях використовували рослини цукрового буряку *Beta vulgaris L.*, інфіковані в лабораторних умовах цистоутворюючою коренепаразитуючою нематодою *Heterodera schachtii*, а також рослини пшениці, інфіковані патогенним мікроміцетом *Fusarium oxysporum graminearum*.

За допомогою методу молекулярної гібридизації мРНК з si/miRNA перевіряли можливість індукції регуляторами росту рослин синтезу si/miRNA з антинематодною активністю. З цією метою насіння цукрового буряку з високою схожістю пророщували на чашках Петрі на безнематодному водному середовищі (контроль) та із суспензією цист нематод, з яких у процесі інкубації при 23 °С з'являлись інфекційні личинки нематод (приблизно на 5–7-й день). У паралельних пробах додавали також композиційні препарати Регоплант, Стімпо, Біоген.

Аналогічні експерименти проводили для перевірки антипатогенної дії малих регуляторних si/miRNA залежно від рівня їхнього синтезу. В цих дослідях насіння озимої пшениці, не оброблене (контроль) та оброблене комплексними поліфункціональними препаратами Регоплант, Стімпо, Біоген, було пророщене в чашках Петрі при температурі 25±5 °С та інфіковане патогенним мікроміцетом *Fusarium oxysporum graminearum*.

Препарати si/miRNA високої чистоти із дослідних рослин виділяли за допомогою раніше розробленого нами методу [21], який складається з етапів: 1) виділення сумарного препарату РНК з клітин рослин [28–30]. Полімерність виділених сумарних препаратів РНК аналізували за допомогою електрофорезу в 1,5 % гелі агарози у присутності 7 М сечовини (гелі забарвлювали розчином етидіумброміду перед фотогра-

фуванням фракцій РНК в ультрафіолеті); 2) розділення полі(A)⁺мРНК (тобто мРНК) та полі(A)⁻мРНК на оліго(dT)-целюлозній колонці; 3) осадження високомолекулярної полі(A)⁻мРНК з елюату проводили за допомогою 10 %-ного розчину поліетиленгліколю (мол. маса 8000) з 0,5 М NaCl, а si/miRNA – рівним об'ємом 96 %-ного етанолу при -22 °С впродовж доби; з колонки полі(A)⁺мРНК знімали 2-3 об'ємами буферу такого складу: 10 мМ трис-НС1 (рН 7,5), 1 мМ EDTA, 0,05 % ДДС-На [31, 32], а після елюції з колонки полі(A)⁺мРНК осаджували етанолом; 4) молекулярна гібридизація в розчині 2xSSC низькомолекулярних si/miRNA з фракцією полі(A)⁺мРНК; 5) нанесення гібридних молекул полі(A)⁺мРНК з si/miRNA на оліго(dT)-целюлозну колонку з наступною елюцією з колонки буфером, вказаним у пункті 3; 6) температурна (95 °С) денатурація очищених за допомогою колонки гібридних молекул полі(A)⁺мРНК з si/miRNA; 7) відокремлення полі(A)⁺мРНК від si/miRNA за допомогою методу фракціонування на оліго(dT)-целюлозній колонці; 8) повторне осадження si/miRNA 96%-ним етанолом та перевіркою чистоти виділених si/miRNA за допомогою електрофорезу у 15%-ному поліакриламідному гелі (ПААГ-електрофорез).

Статистичну обробку отриманих даних проводили методом дисперсійного аналізу.

Результати та обговорення

У проведених лабораторних дослідах виявлено, що комплексні поліфункціональні препарати Регоплант і Стімпо значно підвищують стійкість рослин до небезпечних паразитів – нематод (цистоутворюючих та галових) і патогенного грибу (фузаріозного міксоміцету). В дослідах *in vitro* отримано результати (морфо-фізіологічні показники росту та розвитку проростків цукрового буряку), що підтверджу-

ють високу ефективність дії композиційних препаратів проти цистоутворюючої нематоди *H. schachtii*. На рис. 1 наведено фото отриманих при вирощуванні на інфекційному фоні (в присутності личинок *H. schachtii*) 5-ти денних проростків цукрового буряку, отриманих з обробленого регулятором росту Стімпо в концентрації 5 мкг/мл насіння: а – дослід та необробленого регулятором росту насіння; б – контроль. Як можна бачити, дослідні рослини під впливом регулятора росту Стімпо виявляють міцний ріст та розвиток на інфекційному фоні, тоді як контрольні рослини гинуть на 5-й день після пророщування.

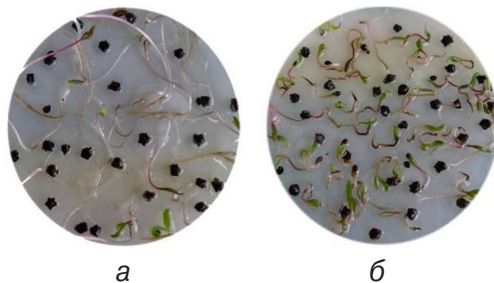


Рис. 1. 5-денні проростки цукрового буряку, вирощені на інфекційному фоні (в присутності личинок цистоутворюючої нематоди *H. schachtii*): а – дослідні рослини, отримані з насіння, обробленого регулятором росту Стімпо в концентрації 5 мкг/мл; б – рослини, отримані з необробленого регулятором росту насіння (контроль)

При постановці експериментів із вивчення молекулярно-генетичних механізмів дії композиційних препаратів ми виходили з того, що ураження організму різними типами патогенів чи паразитів індукує синтез специфічних до їхньої структури мРНК пул si/miRNA і що регулятори росту стимулюють синтез si/miRNA, завдяки чому підвищується імунітет рослин за вказаним вище механізмом дії si/miRNA. Отже, отримання відповідей на поставлені питання може допомогти створенню нового покоління регуляторів росту з властивостями вибіркової активації синтезу si/miRNA, специфічних

до мРНК того чи іншого патогена або паразита.

Результати ПААГ-електрофорезу, наведені на рис. 2, свідчать, що виділені з проростків цукрового буряку препарати si/miRNA високої чистоти мали розмір 21–25 нуклеотидів, що відповідає класичним параметрам цих типів РНК.

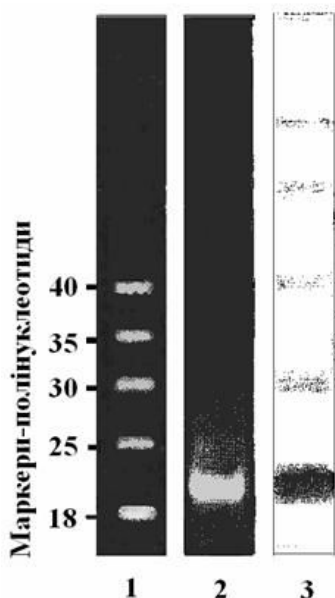


Рис. 2. ПААГ-електрофорез si/miRNA з проростків цукрового буряку. Маркерні полінуклеотиди (в цифрах наведена довжина в нуклеотидах) та препарат si/miRNA на доріжках гелю (відповідно 1 та 2) були насичені етидієм бромідом; радіоавтограф ^{33}P мічених si/miRNA з гелю (доріжка 3)

Результати, наведені у табл. 1, свідчать про зниження рівня синтезу власне клітинних si/miRNA при інфікуванні рослин цукрового буряку личинками нематод і, навпаки, про значне підвищення синтезу антинематодних si/miRNA під впливом композиційних препаратів Стімпо, Регоплант з біозахисними властивостями, внаслідок чого – зменшення ураження нематодами клітин рослин під впливом цих препаратів.

В експериментах зі встановлення механізмів антипатогенної дії регуляторів росту ми враховували отримані раніше в польових умовах дані [17, 20] про значне посилення захисних властивостей різних сортів пшениці до патогенного мікроміцету *Fusarium oxysporum graminearum*. В лабораторних дослідах, проведених на оброблених регуляторами росту з біозахисними сполуками (Біоген, Стімпо, Регоплант) рослинах ярої пшениці сорту Грізо, було отримано результати, які свідчать про різке підвищення стійкості цих рослин (~ до 35–70 %) до патогенного мікроміцету *Fusarium oxysporum graminearum*. Методом дот-блот-гібридизації цитоплазматичних мРНК (через кДНК) і визначенням раніше гормонального складу у контрольних та дослідних рослин [20] встановлено, що підвищення урожайності та стійкості культур до шкідників пов'язано із суттєвими змінами популяційних характеристик (наборів) мРНК та малих регуляторних si/miRNA, можливо, за рахунок вибіркового переключення активності генів у відповідних мультисімействах генів (табл. 2).

Висновки

За допомогою методу дот-блот-гібридизації вперше встановлено популяційні si/miRNA різниці між контрольними проростками цукрового буряку та рослинами, що оброблювалися композиційними препаратами – регуляторами росту з біозахисними властивостями, а також рослинами, які обробляли регуляторами на штучно створеному нематодою *H. schachtii* інфекційному фоні. Суттєві зміни в популяційних характеристиках si/miRNA проростків рослин ярої пшениці сорту «Грізо» виявлено при вивченні відсотка гомології si/miRNA до мРНК у дорослих рослин, що вирощувалися з насіння, обробленого регуляторами росту рослин, не інфікованих та інфікованих патогенним мікроміцетом *Fusarium oxysporum graminearum*. При цьому спостері-

Таблиця 1. Ступінь (%) відмінностей за рівнем гібридизації популяції цитоплазматичних P³³-мРНК з гомологічними si/miRNA з рослин цукрового буряку, інфікованих нематодою *H. schachtii* та оброблених поліфункціональними композиційними регуляторами, щодо контрольних рослин

Назва регуляторів росту	Контроль	% аверсектинів до регуляторів росту	Варіанти дослідів	
			рослини, оброблені регуляторами росту	рослини, оброблені регуляторами росту, + нематода
Біоген (Емістим + аверсектини)	98*	0,2	96±0,54** (2%)	86±0,46** (12%)
		2,5	94±0,72** (4%)	88±0,58** (10%)
		5,0	91±0,66** (7%)	92±0,62** (6%)
Стімпо (Біолан + аверсектини)		0,2	97±0,58** (1%)	82±0,64** (16%)
		2,5	93±0,84** (5%)	84±0,72** (14%)
		5,0	92±0,62** (6%)	87±0,68** (11%)
Регоплант (Радостим + аверсектини)		0,2	94±0,38** (4%)	86±0,48** (12%)
		2,5	92±0,73** (6%)	88±0,52** (10%)
		5,0	88±0,68** (10%)	90±0,38** (8%)

* – наявність достовірних відмінностей власне в контролі, p<0,05, n=3; ** – наявність достовірних відмінностей від контролю, p<0,05, n=3.

Примітка. Як контроль використовували відсоток гібридизації P³³-мРНК з гомологічною si/miRNA з рослин, які не обробляли регуляторами та нематодами.

Ступінь (%) відмінностей вивчали за допомогою методу дот-блот-гібридизації. В досліді використовували 7-денні проростки цукрового буряку; в дослідні проби (в чашки Петрі) додавали по 20 мкл розчину кожного з композиційних препаратів регуляторів росту. Практично всі проростки буряку, оброблені нематодами без регуляторів росту, гинули на 5-й день інкубації.

Таблиця 2. Ступінь (%) відмінностей за рівнем гібридизації популяції цитоплазматичних P³³-мРНК з гомологічною si/miRNA з проростків ярої пшениці сорту «Грізо», що були вирощені з насіння, обробленого регуляторами росту та патогенним мікроміцетом *Fusarium oxysporum graminearum*, щодо контрольних (одномісячних) рослин

Назва регуляторів	Контроль	% аверсектинів до регуляторів	Варіанти дослідів	
			рослини, оброблені регуляторами росту	рослини, інфіковані <i>Fusarium oxysporum graminearum</i> та оброблені регуляторами росту
Біоген (Емістим + аверсектини)	98*	0,2	95±0,54** (3%)	82±0,46** (18%)
		2,5	92±0,72** (6%)	88±0,58** (10%)
		5,0	91±0,66** (7%)	92±0,62** (6%)
Стімпо (Біолан + аверсектини)		0,2	97±0,58** (1%)	80±0,64** (18%)
		2,5	93±0,84** (5%)	89±0,72** (9%)
		5,0	90±0,62** (8%)	90±0,68** (8%)
Регоплант (Радостим + аверсектини)		0,2	94±0,38** (4%)	86±0,48** (12%)
		2,5	89±0,73** (9%)	90±0,52** (8%)
		5,0	87±0,68** (11%)	92±0,38** (6%)

* – наявність достовірних відмінностей власно в контролі, p<0,05, n=3; ** – наявність достовірних відмінностей від контролю, p<0,05, n=3.

Примітка. Як контроль використовували відсоток гібридизації P³³-мРНК з гомологічною si/miRNA з рослин, не інфікованих патогенним мікроміцетом *Fusarium oxysporum graminearum* та не оброблених регуляторами росту.

Ступінь (%) відмінностей вивчали за допомогою методу дот-блот-гібридизації. В досліді використовували дорослі (одномісячні) рослини ярої пшениці сорту «Грізо», вирощені з насіння, що не оброблялося та оброблялося регуляторами росту на інфекційному фоні з мікроміцету *Fusarium oxysporum graminearum*.

гали наявність змін, що залежать від концентрації регуляторів росту.

Перелік літератури

1. *Elbashir S.M., Lendeckel W., Tuschl T.* RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs // *Genes Dev.* – 2001. – Vol. 15. – P. 188 – 200.
2. *Hamilton A., Voinnet O., Chappell L. et al.* Two classes of short interfering RNA in RNA silencing // *The EMBO Journal.* – 2002. – Vol. 21, № 17. – P. 4671 – 4679.
3. *Lee Y., Ahn C., Han J. et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing // *Nature.* – 2003. – Vol. 425. – P. 415 – 419.
4. *Mourelatos Z., Dostie J., Paushkin S. et al.* miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs // *Genes Dev.* – 2002. – Vol. 16. – P. 720 – 728.
5. *Leung R.K.M., Whittaker P.A.* RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics // *Pharmacology and Therapeutics.* – 2005. – № 107. – P. 222 – 239.
6. *Aravin A., Tuschl T.* Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing // *FEBS Letters.* – 2005. – V. 579. – P. 5830 – 5840.
7. *Fuller V.L., Lilley C.J., Urwin P.E.* Nematode resistance // *New Phytologist.* – 2008. – Vol. 180. – P. 27 – 44.
8. *Bakhtia M., Charlton W.L., Urwin P.E. et al.* RNA interference and plant parasitic nematodes // *Trends in Plant Science.* – 2005. – Vol. 10, № 8. – P. 362 – 367.
9. *Gheysen G., Vanholme B.* RNAi from plants to nematodes // *Trends in Biotechnology.* – 2006. – Vol. 25, № 3. – P. 89 – 92.
10. *Knox D.P., Geldhof P., Visser A., Britton C.* RNA interference in parasitic nematodes of animals: a reality check? // *Trends in Parasitology.* – 2007. – Vol. 23, № 3. – P. 105 – 107.
11. *Jian X., Zhang L., Li G. et al.* Identification of novel stress-regulated microRNAs from *Oryza sativa* L. // *Genomics.* – 2010. – Vol. 95. – P. 47 – 55.
12. *Chen R., Hu Z., Zhang H.* Identification of MicroRNAs in Wild Soybean (*Glycine soja*) // *J. of Integrative Plant Biology.* – 2009. – Vol. 51, № 12. – P. 1071–1079.
13. *Park W., Li J., Song R., Messing J., Chen X.* CARPEL FACTORY, a Dicer Homolog, and HEN1, a Novel Protein, Act in microRNA Metabolism in *Arabidopsis thaliana* induced silencing complex (RISC), which targets homologous RNAs for degradation // *Current Biology.* – 2002. – Vol. 12. – P. 1484–1495.
14. *Llave C., Kasschau K.D., Rector M.A., Carrington J.C.* Endogenous and Silencing-Associated Small RNAs in Plants // *Plant Cell.* – 2002. – Vol. 14. – P. 1605–1619.
15. *Lu C., Meyers B.C., Green P.G.* Construction of small RNA cDNA libraries for deep sequencing // *Methods.* – 2007. – Vol. 43. – P. 110 – 117.
16. *Yang T., Xue L., An L.* Functional diversity of miRNA in plants // *Plant Science.* – 2007. – Vol. 172. – P. 423 – 432.
17. *Пономаренко С.П., Терек О.И., Грицаенко З.М., Бабаянц О.В., Моисеева Т.В., Ху Вень Ксю, Икин Д.* Биорегуляция роста и развития растений. – Глава 4 монографии «Биорегуляция микробно-растительных систем» / Под. ред. Иутинской Г.А. и Пономаренко С. П. – К.: Ничлава, 2010. – 464 с.
18. *Білявська Л.О., Козирицька В.Є., Валагурова В.О., Іутинська Г.О.* Аверком – новий вітчизняний препарат нематоцидної і фітостимулюючої дії // *Сільськогосподарська мікробіологія (Міжвід. тематич. наук. збірник).* — Чернівці: ЦНТЕІ. – 2008. — Вип. 7. — С. 22–29.
19. *Иутинская Г.А., Валагурова Е.В., Козирицкая В.Е., Белявская Л.А., Петрук Т.В., Пономаренко С.П., Икин Д.* Аверком – новый антипаразитарный препарат. – Глава 1 монографии «Биорегуляция микробно-растительных систем» / Под. ред. Иутинской Г.А. и Пономаренко С.П. – К.: Ничлава, 2010. – 464 с.
20. *Tsygankova V.A., Galkin A.P., Galkina L.O., Musatenko L.I., Ponomarenko S.P., Iutynska H.O.* Gene expression under regulators' stimulation of plant growth and development. – Chapter 3 of the Monograph «New plant growth regulators: basic research and technologies of application» / Ed. S.P. Ponomarenko, H.O. Iutynska. – Kyiv: Nichlava, 2011. – 211 p.
21. *Циганкова В.А., Андрусевич Я.В., Блюм Я.Б.* Виділення з клітин рослин малих регуляторних si/ miRNA з антинематодною активністю // *ДАН України.* – 2011. – № 9. – С. 159–164.
22. *Elbashir S.M., Lendeckel W., Tuschl T.* RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs // *Genes and Development.* – 2001. – Vol. 15. – P. 188–200.
23. *Hamilton A., Voinnet O., Chappell L., Baulcombe D.* Two classes of short interfering RNA in RNA silencing // *EMBO Journal.* – 2002. – Vol. 21, № 17. – P. 4671 – 4679.
24. *Lee Y., Ahn C., Han J. et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing // *Nature.* – 2003. – Vol. 425. – P. 415 – 419.
25. *Mourelatos Z., Dostie J., Paushkin S. et al.* miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins

- containing numerous microRNAs // *Genes Dev.* – 2002. – Vol. 16. – P. 720 – 728.
26. Leung R. K. M., Whittaker P. A. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics // *Pharmacol. Therapeutics.* – 2005. – № 107. – P. 222–239.
 27. Aravin A., Tuschl T. Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing // *FEBS Letters.* – 2005. – Vol. 579. – P. 5830–5840.
 28. Tsygankova V. A., Blume Ya.B. et al. An unusual minor protein appearing in embryonic axis cells of haricot bean seeds following germination process stimulated by 6-methylthiouracil // *Biopolymers and cell.* – 1998. – Vol. 14, № 5. – P. 438 – 448.
 29. Tsygankova V. A. Concerning the peculiarities of gene expression changes in plant leaf cells during twenty-four-hour period // *Біотехнологія.* – 2010. – Т. 3, № 4. – P. 86–95.
 30. Tsygankova V.A., Musatenko L.I., Ponomarenko S.P., Galkina L.A., Andrusevich Ja. V., Galkin A.P. Change of functionally active cytoplasmic mRNA populations in plant cells under growth regulators action and biological perspectives of cell-free systems of protein synthesis // *Біотехнологія.* – 2010. – Т. 3, № 2. – С. 19–32.
 31. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual.* – New York: Cold Spring Harbor Lab, 1982. – 480 p.
 32. *Promega protocols and applications guide.* Second edition. – USA: Promega Corporation, 1991. – 422 p.

Представлено В.А. Кунахом
Надійшла 28.03.2012

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА РАСТЕНИЙ С БИОЗАЩИТНЫМИ СВОЙСТВАМИ

В.А. Цыганкова¹, С.П. Пономаренко²,
Я.Б. Блюм³

¹ Институт биоорганической химии и нефтехимии
НАН Украины

Украина, г. Киев-94, МСП-660 02660, ул. Мурманская, 1

e-mail: vTsygankova@ukr.net

² Межведомственный научно-технологический
центр «Агробиотех» НАН и МОН Украины

Украина, 02160, г. Киев, Харьковское шоссе, 50

³ Институт пищевой биотехнологии и геномики
НАН Украины

Украина, 04123, г. Киев, ул. Осиповского, 2а
e-mail: cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net

Цель. Выяснить молекулярно-генетические механизмы повышения устойчивости растений сахарной свеклы и яровой пшеницы к патогенным организмам. **Методы.** Исследовали растения сахарной свеклы *Beta vulgaris L.*, инфицированные цистообразующей корнепаразитирующей нематодой *Heterodera schachtii*, а также растения пшеницы, инфицированные патогенным микромицетом *Fusarium oxysporum graminearum*. С помощью метода молекулярной гибридизации мРНК с si/miRNA проверяли возможность индукции регуляторами роста растений синтеза si/miRNA с антипатогенной активностью. Использовали метод дот-блот-гибридизации мРНК с si/miRNA. **Результаты.** Впервые показано, что регуляторы роста растений повышают стойкость растений сахарной свеклы к нематоды *Heterodera schachtii* и растений яровой пшеницы к патогенному микромицету *Fusarium oxysporum graminearum* путем стимуляции синтеза малых регуляторных si/miRNA. **Выводы.** Установленные различия в популяциях si/miRNA между контрольными растениями сахарной свеклы и яровой пшеницы, и опытными растениями, обработанными композиционными препаратами с биозащитными свойствами на искусственно созданном нематодой *Heterodera schachtii*, а также патогенным микромицетом *Fusarium oxysporum graminearum* инфекционном фоне, свидетельствуют о существовании гибкой системы перепрограммирования генома клеток растений под влиянием разных внешних регуляторных факторов.

Ключевые слова: регуляторы роста растений, малые регуляторные si/miRNA, устойчивость растений к патогенам.

THE MOLECULAR-GENETIC MECHANISMS OF PLANT GROWTH REGULATORS WITH BIOPROTECTIVE PROPERTIES

V.A. Tsygankova¹, S.P. Ponomarenko²,
Ya. B. Blume³

¹ Institute of Bioorganic Chemistry and
Petrochemistry, Natl. Acad. Sci. of Ukraine
Ukraine, Kyiv-94, МСП-660 02660,

Murmanskaya str., 1

e-mail: vTsygankova@ukr.net

²National Enterprise Interdepartmental Science & Technology Center «Agrobiotech» of NAS and MES of Ukraine

Ukraine, 02160, Kyiv, Charkovskoye shosse, 50

³Institute of Food Biotechnology and Genomics, Natl. Acad. Sci. of Ukraine

Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2a

e-mail: cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net

Aim. To find out the molecular-genetic mechanisms of increasing sugar beet and spring wheat plants resistance to pathogenic organisms. **Methods.** The plants of sugar beet *Beta vulgaris L.*, infected with cyst root nematode *Heterodera schachtii*, and plants of spring wheat, infected with pathogenic micromycete *Fusarium oxysporum graminearum*, were investigated. Using method of mRNA molecular hybridization with si/miRNA the possibility of induction by plant growth regulators of synthesis si/miRNA with antipathogenic activity was verified. The method of mRNA DOT-blot-hybrid-

ization with si/miRNA was applied. **Results.** It was shown for the first time that plant growth regulators may increase the resistance of sugar beet plants against parasitic nematodes *Heterodera schachtii* as well as resistance of spring wheat plants to pathogenic micromycete *Fusarium oxysporum graminearum* through enhancement of synthesis of small regulatory si/miRNA. **Conclusions.** The established distinctions in populations of si/miRNA between control plants of sugar beet and spring wheat as well as the experimental plants, treated with composite preparations showing bioprotective properties against artificially created by nematode *Heterodera schachtii*, and also by pathogenic micromycete *Fusarium oxysporum graminearum* infectious background, indicate the existence of flexible system for reprogramming of plant cells genome under the influence of different external regulatory factors.

Key words: plant growth regulators, the small regulatory si/miRNA, the plant resistance to pathogens.