

Оригинальные работы

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

В.А. ЦИГАНКОВА¹, Я.В. АНДРУСЕВИЧ¹,
С.П. ПОНОМАРЕНКО², А.П. ГАЛКІН³, Я.Б. БЛЮМ³

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

² Міжвідомчий науково-технологічний центр «Агробіотех»
НАН і МОН України, Київ

³ Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, Київ
E-mail: cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net

ОТРИМАННЯ ТА АМПЛІФІКАЦІЯ кДНК КОНСЕРВАТИВНОЇ ДІЛЯНКИ ГЕНА 8H07 НЕМАТОДИ HETERODERA SCHASHTII З ВИСОКОЮ СПОРІДНЕНІСТЮ ДО ЙОГО ГОМОЛОГА У РІПАКА



Розроблено оригінальний метод виділення з клітин рослин малих регуляторних РНК (si/miRNA). За допомогою ПЛР проведено полімеразне копіювання фрагмента кДНК гена 8H07 нематоди Heterodera schashtii. Шляхом гібридизації si/miRNA рослин з фрагментом кДНК консервативної ділянки у гена 8H07 нематоди підтверджено високий ступінь їхньої гомології. В подальшому ампліфікований кДНК фрагмент гена 8H07 нематоди буде використано для створення рекомбінантного гена з антисенсовою послідовністю dsRNA для підвищення стійкості рослин ріпака до паразитичної нематоди.

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

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2012. № 6

Вступ. Паразитичні нематоди для більшості сільськогосподарських видів рослин є інфекційними та руйнівними шкідниками, що спричиняють великі втрати врожаю. В усьому світі щорічні втрати врожаїв внаслідок ураження рослин нематодами становлять понад 125 млрд доларів [1].

Паразитичні нематоди належать до облигатних ендопаразитів, які мають постійну локалізацію в місцях ураження рослин-господарів. Свій життєвий цикл вони починають як організми, що неспроможні харчуватися, перетворюючись на ювенільній стадії розвитку в інфекційні личинки, які і потрапляють із ґрунту в корені рослин-господарів.

Для успішного паразитування нематоди використовують секреторні білки, які через крихітний отвір всмоктувальної трубочки (стилети) вводяться ними в спеціалізовані метаболічно активні багатоядерні клітини рослин, завдяки чому нематоди отримують поживні речовини [2]. Ці клітини – сайти харчування (синтиції) – утворюються в процесі диференціації із звичайних клітин рослин і мають вигляд або гігантських клітин, що є специфічними для нематод кореневих вузлів, або схожих на цисти клітин, які є характерними для цистоутворюючих нематод. Секреторні білки нематод в інфікованих ними клітинах рослин викликають значні порушення експресії генів шляхом прямого проникнення до ядра [2, 3] або ж через білки-посередники [4, 5], внаслідок чого змінюється клітинний цикл [6], відбувається реорганізація цитоскелету [7], порушуються процеси ендоредуплікації та деградації білків-мішеней [8], регуляція сигнальних і метаболічних процесів [9], змінюється баланс фітогормонів [10], знижуються імунзахисні реакції рослин та припиняється ріст і розвиток їх в цілому [11].

Нині ідентифіковано понад 60 фітопаразитичних генів, що контролюють життєвий цикл у нематод [12, 13]. Деякі з цих генів мають високий рівень гомології з багатьма еукаріотичними генами [2]. Продуктами їхньої експресії є найбільш функціонально важливі для нематод білки, що беруть участь в реплікації ДНК, транскрипції, процесингу РНК, синтезі тРНК, трансляції, контролі функціонування рибосом і тРНК, процесах модифікації, секреції, переносу білків

та контролі їх стабільності і деградації, контролі функцій мітохондрій та метаболізму білків-посередників, контролі клітинного циклу, структури клітин, передачі ендо- та міжклітинних сигналів, процесів ендоцитозу, іонній регуляції, а також білки, відповідальні за репродуктивний цикл нематод (наприклад, мажорний білок сперми або хітинсинтетаза) [14].

В природних умовах центральну роль в боротьбі з патогенними організмами у клітинах рослин відіграють малі регуляторні РНК (si/miRNA), структура яких є антисенсовою до певних ділянок мРНК паразитів. Шляхом комплементарного спарювання з цими мРНК в клітинах si/miRNA інгібують трансляцію чужинної мРНК. У більшості рослин кількості si/miRNA, що синтезується, недостатньо для протидії патогенним організмам [15–23]. Але з освоєнням технології інтерференції РНК (RNAi) стало можливим розвивати генно-інженерні стратегії контролю розповсюдження нематод шляхом посттрансляційного сайленсінгу генів, які є життєво важливими для паразитичного циклу та потрапляння в організм рослини-господаря. Відкриття малих регуляторних РНК (si/miRNA), що виконують головну роль в регуляції посттрансляційного сайленсінгу генів, надає можливості здійснювати контроль експресії генів та проводити аналіз їхніх функцій [25].

Останнім часом великі успіхи досягнуто у клонуванні цих генів, конструюванні на їхній основі антисенсових dsRNA векторів та створенні трансгенних рослин із підвищеною стійкістю до нематод-паразитів [25–28]. Паралельно також ідентифіковано гени рослин-господарів, гіперекспресія яких сприяє проникненню та розмноженню паразитичних нематод. Встановлено, що блокування експресії цих генів за допомогою трансформації антисенсовими (комплементарними) до їх нуклеотидних послідовностей si/miRNA спричиняє підвищення резистентності рослин до патогенів, в результаті чого знижується рухливість личинок нематод, здатність проникати у корені і формувати сайти харчування, порушуються метаморфоз та репродуктивний цикл нематод [29–32].

До найбільш важливих фітопаразитичних генів, що контролюють життєвий цикл цисто-

утворюючої нематою сої *Heterodera glycines* і цистоутворюючої нематою цукрових буряків *Heterodera schachtii* (яка паразитує також на рослинах ріпака), належать сімейства генів секреторних білків клітин дорзальних езофагеальних залоз нематод. До них належать гени 3B05 (AF469058), 4G06 (AF469060), 8H07 (AF500024) та 10A06 (AF502391), що характеризуються високим ступенем гомології (90 %) у цих видів нематод (їхні нуклеотидні послідовності ідентичні на 40 % генам рослин-господарів) [8], а також ген Hs4F01, що має нуклеотидну послідовність, на 33 % ідентичну гомологічному гену рослин [33]. Конституційна експресія цих генів в рослинах-господарях сприяє гіперчутливості до нематодної інфекції, тобто ураженню рослин нематодами. В організмах нематод пік експресії гена Hs4F01 спостерігається при формуванні синтицій у рослин, а інші чотири гени – 3B05, 4G06, 8H07 та 10A06 – гіперекспресуються в період після харчування нематод [8, 34].

З'ясовано біологічні функції білків, що кодується цими генами. Ген 3B05 кодує білок, який має домен, що зв'язує целюлозу [35]. Ген 4G06 кодує ідентичний широко розповсюдженому у рослин білку убіхітину пептид, що має 14 амінокислот, з унікальним, присутнім тільки у нематод С-кінцевим доменом, який може бути мішенню для сайленсінгу антисенсовими si/miRNA, що синтезуються у трансгенних рослинах [8, 12]. Ген 8H07 кодує білок, ідентичний SKP1 білкам рослин, що є компонентами SCF-комплексу протеолітичних ферментів (протеосоми), за участі якого відбувається процес поліубіхітинування та деградації білків [8, 12]. Виявлено, що цей нематодний ген 8H07 має консервативну ділянку (CR) 8H07^{CR}, гомологічну консервативній ділянці гена 8H07 рослин, що кодує SKP1 білки, а також унікальний регіон (UR) 8H07^{UR}, специфічний тільки для нематод. Завдяки присутності у консервативній ділянці гена 8H07 нематод значної кількості нуклеотидних послідовностей, що відрізняються від послідовностей рослин, а також присутності унікальної для нематод ділянки UR створюється можливість уникнути неспецифічного сайленсінгу цього гена у рослин, тому що ділянки і CR,

і UR можна використовувати для конструювання векторів експресії з антисенсовими до них dsRNA в трансгенних рослинах. Ген 10A06 кодує білок, ідентичний RING-H2 Zinc-finger-білкам рослин – компонентам SCF-комплексу, що відповідає за поліубіхітинування білків [8, 12]. Для експериментів з RNAi мішенню може бути обраний домен гена 10A06, що кодує RING-H2 Zinc-finger-білок, але за нуклеотидною послідовністю істотно відрізняється від аналогічного домену гена 10A06 рослин, завдяки чому можна уникнути неспецифічного сайленсінгу цього гена у рослин.

Ген Hs4F01, що кодує білок анексин, має чотири консервативних домени. Вони складаються з 60–70 нуклеотидних послідовностей, які чотирикратно повторюються та мають сайти зв'язку з кальцієм [8, 36]. Родина білків анексинів бере участь в процесах, що регулюються кальцієм на поверхні клітинних мембран нематод. В клітинах рослин білки анексини виконують більш різноманітні функції. Наприклад, анексини гороху та кукурудзи концентруються в секреторних клітинах кореневих чохлаків у ксилемі та флоемі [37, 38]. Анексини бавовнику інгібують активність ферменту калозосинтетази [38], а у *Arabidopsis* існує не менше восьми генів анексинів, деякі з котрих експресуються у відповідь на абіотичні стреси та виконують захисні функції [33, 39]. Безумовно, всі представлені гени можуть бути використані для клонування, конструювання антисенсових до їхніх послідовностей dsRNA векторів і створення резистентних до нематод-паразитів трансгенних рослин. Тому розробка методів ідентифікації цих генів, клонування та конструювання на їхній основі векторів для генетичної трансформації рослин є актуальним напрямком розвитку генетичної інженерії

Як було раніше виявлено у проведених нами молекулярно-генетичних дослідженнях, стійкість рослин до різних патогенів можна значно підвищити завдяки стимуляції синтезу власних малих регуляторних si/miRNA, що беруть участь в процесах інтерференції РНК за допомогою обробки їх регуляторами росту природного походження із біозахисними властивостями [40, 41]. Ефективність ура-

ження рослин нематодами залежить від секреторних білків, що синтезуються в езофагеальних залозах паразитів під час проникнення всмоктувальної трубочки (стилет) в клітини коренів рослин та формування в цих місцях утворення синтиціїв [8]. Грунтуючись на провідній ролі генів, що кодують синтез цих білків і тим самим сприяють виживанню шкідників, метою наших експериментів було розробити підходи до підвищення числа копій в інфікованих клітинах ріпака антисенсових dsRNA, специфічних до структури одного з генів (8H07) секреторного білка нематоди, на основі сучасних методів генетичної інженерії в комбінації з біостимуляцією експресії генів dsRNA.

Матеріали та методи. Насіння ріпака з високою схожістю пророщували в чашках Петрі на безнематодному водному середовищі (контроль) та із суспензією цист корене-паразитуючої нематоди *H. schachtii*, з яких у процесі інкубації при 23 °С з'являлись личинки нематод (приблизно на 5–7-й день).

Для додаткового підвищення стійкості ріпака до нематодної інвазії рослини обробляли регулятором росту Регоплант* з біозахисними властивостями [41, 42]. Цей полікомпонентний препарат містить в своєму складі продукти життєдіяльності в культурі *in vitro* гриба-міксоміцета, вилученого з кореневої системи женьшеню (суміш амінокислот, вуглеводів, жирних кислот, полісахаридів, фітогормонів та мікроелементів), та аверсектинів – комплексних антипаразитарних макролідних антибіотиків, продуктів метаболізму ґрунтового стрептоміцету *Streptomyces avermitilis* [43]. Стрептоміцети відомі як продуценти не лише антибіотиків, але й таких біологічно активних речовин, які виявляють фітозахисну та ріст-стимулювальну дію на рослини. Це різного роду гормони, вітаміни, амінокислоти, каротиноїди, ферменти, токсини та інші речовини, що впливають на ростові процеси рослин, а саме стимулю-

* Створений в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України спільно з Державним підприємством «Міжвідомчий науково-технологічний центр «Агробіотех» НАН і МОН України».

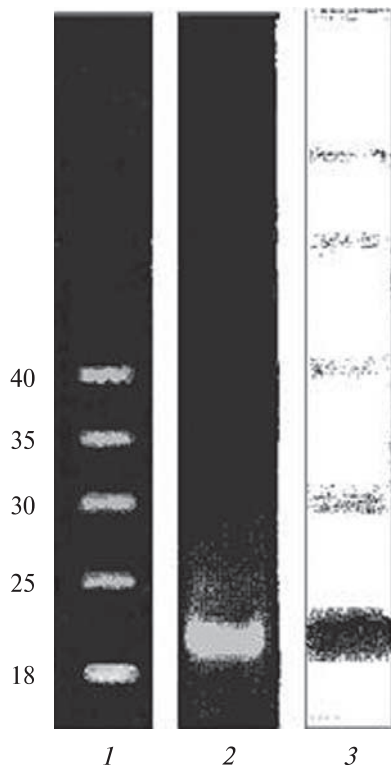


Рис. 1. ПААГ-електрофорез si/miRNA з проростків ріпака. Маркерні полінуклеотиди (по вертикалі – довжина в нуклеотидах) та препарат si/miRNA на доріжках гелю (відповідно 1 та 2) насичені етидіум бромідом; радіоавтограф ^{33}P мічених si/miRNA з гелю (доріжка 3)

ють проростання насіння і підвищують врожайність [42]. В досліджах використовували Регоплант з концентрацією аверсектинів 10 мкг/мл.

Виділення si/miRNA з клітин дослідних рослин ріпака здійснювали за допомогою удосконаленого розробленого нами раніше [40] оригінального методу, який складався з наступних етапів:

1) виділення сумарного препарату РНК з клітин рослин [43–45]; полімерність виділених сумарних препаратів РНК аналізували за допомогою електрофорезу в 1,5%-ному гелі агарози у присутності 7 М сечовини за методом Локера [46] (гелі фарбували розчином етидіум броміду перед фотографуванням фракцій РНК в ультрафіолеті);

2) розділення полі(A)⁺мРНК (тобто мРНК) та полі(A)⁻мРНК на оліго(dT)-целюлозній колонці з метою подальшого використання по-

лі(A)⁺мРНК для тестування функціональної активності si/miRNA в безклітинних системах білкового синтезу з проростків пшениці [44, 46];

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; полі(A)⁺мРНК з колонки знімали 2–3 об'ємами буфера: 10 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 1 мМ ЕДТА, 0,05 % ДДС-Na [47, 48], а після елюції з колонки полі(A)⁺мРНК осаджували етанолом;

4) молекулярна гібридизація в розчині 2×SSC 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 п. 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 перевірка чистоти виділених si/miRNA за допомогою електрофорезу у 15%-ному поліакриламідному гелі (ПААГ-електрофорез) (рис. 1).

Для дослідів по гібридизації si/miRNA з консервативною ділянкою кДНК нематод, ампліфікованою шляхом ПЛР, перед одержанням si/miRNA її інтенсивно мітили *in vivo* ^{33}P за допомогою $\text{Na}_2\text{HP}^{33}\text{O}_4$ [44].

Виділення сумарного препарату мРНК з клітин нематод H. schachtii. Яйця нематод *H. schachtii*, промиті та очищені в градієнті сахарози, поміщали на просочений розчином 3,14 мМ ZnSO_4 фільтровальний папір в чашки Петрі та інкубували в термостаті при температурі 26 °С протягом 5–7 днів до появи личинок нематод. Личинки збирали та стерилізували спочатку 1 год в 0,001%-ному розчині хлоргексидину та 7 хв у 0,001%-ному розчині хлориду ртуті.

Виділення сумарного препарату РНК з личинок здійснювали за допомогою того ж

самого методу, який використовували і для виділення сумарного препарату РНК з рослин. Полімерність виділених сумарних препаратів РНК аналізували за допомогою методу Локера [46].

Розділення полі(А)⁺РНК (тобто мРНК) та полі(А)⁻РНК, осадження високомолекулярної полі(А)⁻мРНК з елюату проводили на оліго(dT)-целюлозній колонці, а також – як описано у п. 2 та 3.

Синтез кДНК на матрицях полі(А)⁺РНК здійснювали за допомогою зворотної транскриптази (ревертази) та [α -³³P] міченого дезокси-ЦТФ [40, 49].

Ампліфікація кДНК послідовностей гена 8H07 нематод за допомогою ПЛР. Для подальшого клонування і конструювання вектора експресії dsRNA, які є за структурою антисенсовими до мРНК нематод, нами обрано ген 8H07 нематоди, що має високий ступінь гомології у консервативній ділянці (CR) по відношенню до такої ж ділянки аналогічного гена рослин. Для ПЛР ампліфікації кДНК послідовностей фрагмента консервативної ділянки гена 8H07 нематоди *H. schachtii* використовували праймери, комплементарні консервативній ділянці цього гена (таблиця).

Ампліфікацію консервативної ділянки кДНК гена 8H07 проводили на термоциклері ABI («Applied Biosciences», Німеччина) з використанням 0,025 од./мкл *Taq* полімерази («New England Biolabs», США) та реагентів фірми «Invitrogen» (США): 1,5 мМ MgCl₂ і 200 мкМ кожного з нуклеотидів – dATP, dTTP, dGTP та dCTP. Температурні режими ПЛР: початкова температура для денатурації становила 94 °C протягом 2 хв, наступні 35 циклів ампліфікації проводили при 94 °C про-

тягом 30 с, при 55 °C – 45 с, при 72 °C – 1 хв; кінцевий цикл елонгації відбувався при 72 °C протягом 7 хв.

Ампліфіковану консервативну ділянку кДНК гена 8H07 аналізували за допомогою електрофорезу в 15%-ному ПААГ, просоченому етидіум бромідом (рис. 2).

Для перевірки наявності гомології між виділеними з оброблених композиційним поліфункціональним препаратом Регоплант рослин ріпака малими регуляторними si/miRNA та ампліфікованим фрагментом кДНК консервативної ділянки гена 8H07 нематоди, елюат кДНК з гелю наносили на модифіковані та активовані нітроцелюлозні мембранні фільтри (Ватман 50, 2-амінофенілтіоефірний папір) та проводили Нозерн-блот гібридизацію [47] з низькомолекулярними ³³P міченими si/miRNA, виділеними з рослин ріпака, що не оброблялись та оброблялись регулятором росту (рис. 3).

Результати досліджень та їх обговорення. З метою створення вектора з антисенсовими dsRNA обрано ген 8H07 нематоди, який кодує один із секреторних білків езофагальних залоз і має високий ступінь гомології в консервативній ділянці з консервативною ділянкою гена 8H07 рослин. Тому було вирішено перевірити ступінь гомології між виділеними нами (з оброблених та не оброблених композиційним поліфункціональним препаратом Регоплант рослин ріпака) малими регуляторними si/miRNA та ампліфікованим фрагментом кДНК консервативного регіону гена 8H07 нематоди.

Результати ідентифікації за допомогою ПААГ-електрофорезу виділених si/miRNA свідчать, що si/miRNA є препаратами високої

Перелік послідовностей праймерів, використаних для ампліфікації гена-мішені 8H07 нематоди *H. schachtii*

Праймер	Послідовності	Кількість пар нуклеотидів, отриманих методом ПЛР
8H07-CR-S-Forward	ATCTCGAGAACCATATTTCCCAAATG	338
8H07-CR-S-Reverse	ATGAATTCTATTTGGTTTGGCATTTGATTCGGCTG	
8H07-CR-AS-Forward	ATTCTAGAAACCATATTTCCCAAATG	
8H07-CR-AS-Reverse	ATAAGCTTTATTTGGTTTGGCATTTGATTCGGCTG	

Примітка. CR – консервативний регіон, S – сенсові, AS – антисенсові послідовності відповідно.

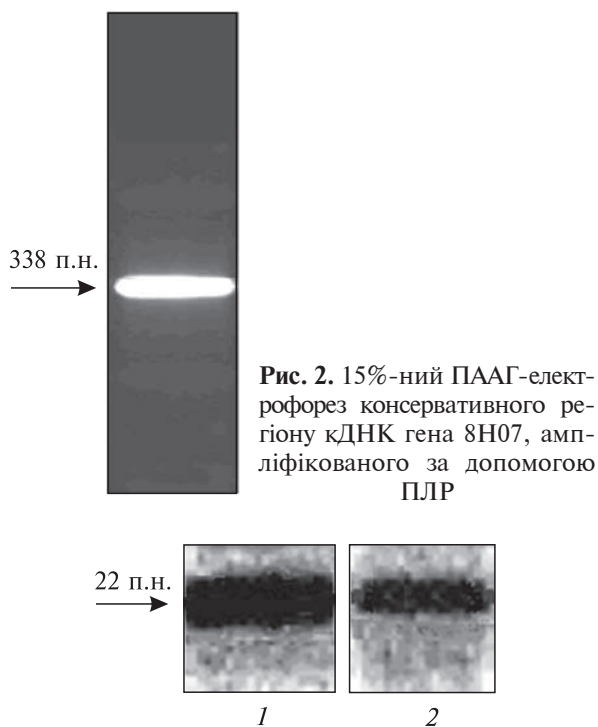


Рис. 3. Нозерн-блот гібридизація ампліфікованого методом ПЛР фрагмента кДНК консервативного регіону гена 8H07 з низькомолекулярними ³³P міченими si/miRNA: 1 – гібриди кДНК з препаратами si/miRNA, виділеними з рослин ріпака, що оброблені регулятором росту; 2 – гібриди кДНК з препаратами si/miRNA, виділеними з рослин ріпака, що не оброблені регулятором росту

чистоти з класичними параметрами цих типів RNA – розміром від 21 до 25 нуклеотидів.

Для ПЛР ампліфікації кДНК послідовностей фрагмента гена 8H07 нематоди *H. schachtii* використовували праймери, комплементарні консервативній ділянці цього гена, що складаються з сенсових та антисенсових до CR регіону послідовностей і містять сайти рестрикції для проведення клонування ампліфікованої консервативної ділянки кДНК гена 8H07 та наступного його внесення у вектор pHannibal (*Xho*I, CTCGAG; *Eco*RI, GAATTC; *Xba*I, TCTAGA, *Hind*III, AAGCTT; *Cla*I, ATCGAT) (таблиця).

За допомогою електрофорезу ампліфікованого консервативного регіону кДНК гена 8H07 у 15%-ному ПААГ, просоченому етидіум бромідом, встановлено наявність чітко вираженої засвіченої в ультрафіолеті смуги в гелі, що

являє собою концентрований препарат молекул відповідної ділянки вказаного гена, яка за даними літератури містить 338 пар нуклеотидів (рис. 2).

Результати Нозерн-блот гібридизації ампліфікованої за допомогою ПЛР консервативної ділянки кДНК гена 8H07 з низькомолекулярними ³³P міченими si/miRNA (рис. 3) підтверджують наявність високої гомології між виділеними нами з оброблених та не оброблених регулятором росту рослин ріпака препаратами si/miRNA та ампліфікованої кДНК, гомологічної фрагменту гена 8H07 нематоди *H. schachtii*.

Отримані результати Нозерн-блот гібридизації засвідчують, що застосування регулятора росту Регоплант значно підвищує рівень синтезу антинематодних si/miRNA, специфічних до консервативної ділянки гена 8H07, що відповідає за інфекційні властивості паразитичної нематоди. Як зазначалось, досягти додаткового підвищення стійкості рослин до нематодної інвазії можна не лише за допомогою обробки препаратом Регоплант, а й з використанням створеними нами аналогічними композиційними препаратами з ріст-стимулювальною та антипаразитарною активністю, також створеними в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України і на Державному підприємстві «Міжвідомчий науково-технологічний центр «Агробіотех» (Стімпо, Біоген та ін.) [40, 41].

Таким чином, завдяки використанню розробленого методу виділення високоочищеного препарату малих регуляторних si/miRNA вдалося встановити, що стійкість рослин ріпака до ураження нематою *H. schachtii* обумовлена різким підвищенням синтезу si/miRNA під дією поліфункціонального препарату Регоплант. За допомогою Нозерн-блот гібридизації встановлено високу спорідненість виділених з клітин ріпака малих регуляторних si/miRNA до ампліфікованого фрагменту кДНК консервативної ділянки гена 8H07 *H. schachtii*. Ці результати свідчать на користь того, що антинематодні властивості препаратів si/miRNA пов'язані з наявністю в них антисенсових (комплементарних) до гена 8H07 нематої послідовностей, завдяки чому відбувається блокування трансляції (сайленсінг) мРНК

нематод, внаслідок чого вони гинуть. Підтвердженням того факту, що в інфікованих нематодами клітинах рослин підвищується синтез специфічних антинематодних si/miRNA, який також додатково підсилюється під впливом Регопланту, є отримані раніше нами результати по інгібуванню синтезу білків на матрицях полі(A)⁺мРНК в безклітинній системі білкового синтезу з проростків пшениці [40, 49]. В цих дослідах встановлено, що додавання в безклітинну систему білкового синтезу препаратів si/miRNA, одержаних з інфікованих рослин, які оброблялись та не оброблялись препаратом Регоплант, призводить до практично повного інгібування трансляції мРНК, одержаних як з личинок нематод, так і з інфікованих рослин. В протилежність цьому препарати si/miRNA, виділені з неінфікованих нематодами клітин рослин, виявляли достатньо низьку інгібуючу активність (за рахунок блокування трансляції власно клітинних мРНК).

В цілому наведені результати вказують на чітку перспективу одержання рослин, стійких до ураження нематодами *H. schachtii*, з використанням генно-інженерних підходів, конструювання векторів експресії антисенсових dsRNA, комплементарних консервативному регіону гена 8H07, та генетичної трансформації ними рослин.

V.A. Tsygankova,
Ya.V. Andrusевич, S.P. Ponomarenko,
A.P. Galkin, Ya.B. Blume

ISOLATION AND AMPLIFICATION
cDNA OF 8H07 GENE CONSERVATIVE
REGION OF NEMATODE *HETERODERA*
SCHACHTII WITH HIGH RELATIONSHIP
TO ITS RAPE HOMOLOG

Original method of small regulatory si/miRNA isolation from plant cells was elaborated. PCR amplification of fragment cDNA 8H07 nematode *Heterodera schachtii* gene was carried out. Using Northern-blot method hybridization of plant si/miRNA with cDNA fragment of conservative region 8H07 gene the presence of their high homology is found out. The amplified cDNA fragment of nematode 8H07 gene in future will be used for creation recombinant gene with complementary antisense dsRNA sequence for increasing resistance of rape plants to parasitic nematodes.

V.A. Цыганкова,
Я.В. Андрусевич, С.П. Пономаренко,
А.П. Галкин, Я.Б. Блюм

ПОЛУЧЕНИЕ И АМПЛИФИКАЦИЯ κДНК
КОНСЕРВАТИВНОГО УЧАСТКА ГЕНА 8H07
НЕМАТОДЫ *HETERODERA SCHACHTII*
С ВЫСОКИМ РОДСТВОМ К ЕГО ГОМОЛОГУ
У РАПСА

Разработан оригинальный метод выделения из клеток растений малых регуляторных РНК (si/miRNA). С помощью ПЦР осуществлено полимеразное копирование фрагмента κДНК гена 8H07 *Heterodera schachtii*. Путем гибридизации si/miRNA растений с фрагментом κДНК консервативного участка гена 8H07 нематоды подтверждена их высокая степень гомологии. В дальнейшем амплифицированный κДНК фрагмент гена 8H07 нематоды будет использован для создания рекомбинантного гена с антисенсовой последовательностью dsRNA для повышения устойчивости растений рапса к паразитической нематоды.

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. Baum T.J., Hussey R.S., Davis E.L. Root-knot and cyst nematode parasitism genes: the molecular basis of plant parasitism // Genet. Engineering. – 2007. – 28. – P. 17–43.
3. 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. Parasitol. – 2007. – 37. – P. 1269–1279.
4. Jammes F., Lecomte P., Almeida-Engler J., Bitton F., Martin-Magniette M., Renou J.P., Abad P., Favery B. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis* // Plant J. – 2005. – 44. – P. 447–458.
5. Ithal N., Recknor J., Nettleton D., Hearne L., Maier T., Baum T.J., Mitchum M.G. Parallel genome-wide expression profiling of host and pathogen during soybean cyst nematode infection of soybean // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2007. – 20. – P. 293–305.
6. Gheysen G., Fenoll C. Gene expression in nematode feeding sites // Ann. Rev. Phytopathol. – 2002. – 40. – P. 191–219.
7. Caillaud M., Lecomte P., Jammes F. et al. MAP65-3 microtubule-associated protein is essential for nematode-induced giant cell ontogenesis in *Arabidopsis* // Plant Cell. – 2008. – 20. – P. 423–437.
8. Gao B., Allen R., Maier T., Davis E.L., Baum T.J.,

- Hussey R.S. The parasitome of the phytonematode *Heterodera glycines* // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2003. – **16**. – P. 720–726.
9. Doyle E.A., Lambert K.N. *Meloidogyne javanica* chormate mutase 1 alters plant cell development // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2003. – **16**. – P. 123–131.
 10. Karczmarek A., Overmars H., Helder J., Goverse A. Feeding cell development by cyst and root-knot nematodes involves a similar early, local and transient activation of a specific auxin inducible promoter element // Mol. Plant Pathol. – 2004. – **5**. – P. 343–346.
 11. Huang G., Allen R., Davis E.L., Baum T.J., Hussey R.S. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2006. – **103**. – P. 14302–14306.
 12. Gao B., Allen R., Maier T., Davis E.L., Baum T.J., Hussey R.S. Identification of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2001. – **14**. – P. 1247–1254.
 13. Wang X., Allen R., Ding X., Goellner M., Maier T., de Boer J.M., Baum T.J., Hussey R.S., Davis E.L. Signal peptide-selection of cDNA cloned directly from the esophageal gland cells of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2001. – **14**. – P. 536–544.
 14. Bradley J. D., Chiapelli B., Gao B., McCarter J.P., Verbsky M.L., Williams D.J. Methods and compositions for root knot nematode control. – Patent WO2009126896. – 2009.
 15. Hamilton A., Voinnet O., Chappell L. et al. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing // EMBO J. – 2002. – **21**, № 17. – P. 4671–4679.
 16. Leung R.K.M., Whittaker P.A. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics // Pharmacol. Therap. – 2005. – **107**. – P. 222–239.
 17. Bakhetia M., Charlton W.L., Urwin P.E. et al. RNA interference and plant parasitic nematodes // Trends Plant Sci. – 2005. – **10**, № 8. – P. 362–367.
 18. Gheysen G., Vanholme B. RNAi from plants to nematodes // Trends Biotechnol. – 2006. – **25**, № 3. – P. 89–92.
 19. Knox D.P., Geldhof P., Visser A., Britton C. RNA interference in parasitic nematodes of animals: a reality check? // Trends Parasitol. – 2007. – **23**, № 3. – P. 105–107.
 20. Auer C., Frederick R. Crop improvement using small RNAs: applications and predictive ecological risk assessments // Trends Biotechnol. – 2009. – **27**, № 11. – P. 644–650.
 21. Padmanabhan Ch., Zhang X., Jin H. Host small RNAs are big contributors to plant innate immunity // Curr. Opin. Plant Biol. – 2009. – **12**, № 4. – P. 465–472.
 22. Chen R., Hu Z., Zhang H. Identification of micro RNAs in wild soybean (*Glycine soja*) // J. Integr. Plant Biol. – 2009. – **51**, № 12. – P. 1071–1079.
 23. Jian X., Zhang L., Li G. et al. Identification of novel stress-regulated microRNAs from *Oryza sativa* L. // Genomics. – 2010. – **95**. – P. 47–55.
 24. Baulcombe D. RNA silencing // Trends Biochem. Sci. – 2005. – **30**. – P. 290–293.
 25. Tytgat T., Vanholme B., De Meutter J., Claeys M., Couvreur M., Vanhoutte I., Gheysen G., Van Criekinge W., Borgonie G., Coomans A., Gheysen G. A new class of ubiquitin extension proteins secreted by the dorsal pharyngeal gland in plant parasitic cyst nematodes // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2004. – **17**. – P. 846–852.
 26. Chen Q., Rehman S., Smant G., Jones J.T. Functional analysis of pathogenicity proteins of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* using RNAi // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2005. – **18**. – P. 621–625.
 27. Rosso M.N., Dubrana M.P., Cimbolini N., Jaubert S., Abad P. Application of RNA interference to root-knot nematode genes encoding esophageal gland proteins // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2005. – **18**. – P. 615–620.
 28. Shingles J., Lilley C.J., Atkinson H.J., Urwin P.E. *Meloidogyne incognita*: molecular and biochemical characterisation of a cathepsin L cysteine proteinase and the effect on parasitism following RNAi // Exp. Parasitol. – 2007. – **115**. – P. 114–120.
 29. Wiig A. Compositions and methods using RNA interference of *OPR3*-like gene for control of nematodes. – Patent US2010115660. – 2010.
 30. Wiig A. Compositions and methods using RNA interference targeting *MTHFR*-like genes for control of nematodes. – Patent US2010107276. – 2010.
 31. Favery B., Abad P., Caillaud M.C. Method for increasing the resistance of a plant to endoparasitic nematodes. – Patent WO2008139334. – 2008.
 32. Ascenzi R. Compositions and methods using RNA interference of *CDPK*-like for control of nematodes. – Patent US2010017910. – 2010.
 33. Clark G.B., Sessions A., Eastburn D.J., Roux S.J. Differential expression of members of the annexin multigene family in *Arabidopsis* // Plant Physiol. – 2001. – **126**. – P. 1072–1084.
 34. Elling A.A., Mitreva M., Recknor J. et al. Divergent evolution of arrested development in the dauer stage of *Caenorhabditis elegans* and the infective

- stage of *Heterodera glycines* // *Genome Biol.* – 2007. – **8**, № 10. – R211.
35. Gao B.L., Allen R., Davis E.L., Baum T.J., Hussey R.S. Developmental expression and biochemical properties of a beta-1,4-endoglucanase family in the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* // *Mol. Plant Pathol.* – 2004. – **5**. – P. 93–104.
36. Creutz C.E. The annexins and exocytosis // *Science.* – 1992. – **258**. – P. 924–931.
37. Clark G.N., Dauwalder M., Roux S.J. Immunolocalization of an annexin-like protein in corn // *Adv. Space Res.* – 1994. – **14**. – P. 341–346.
38. Delmer D.P., Potikha T.S. Structures and function of annexins in plants // *Cell. Mol. Life Sci.* – 1997. – **53**. – P. 546–553.
39. Cantero A., Barthkur S., Bushart T.J., Chou S., Morgan R.O., Fernandez M.P., Clark G.B., Roux S.J. Expression profiling of the Arabidopsis annexin gene family during germination, de-etiolation, and abiotic stress // *Plant Physiol. Biochem.* – 2006. – **44**. – P. 13–24.
40. Циганкова В.А., Андрусевич Я.В., Блюм Я.Б. Виділення з клітин рослин малих регуляторних si/miRNA з антинематодною активністю // *Доп. НАН України.* – 2011. – № 9. – С. 159–164.
41. Tsygankova V.A., Galkin A.P., Galkina L.A., Musatenko L.I., Ponomarenko S.P., Iutynska H.O. Gene expression under regulators' stimulation of plant growth and development // *New plant growth regulators: basic research and technologies of application* / Eds S.P. Ponomarenko, H.O. Iutynska. – Kyiv : Nichlava, 2011. – 211 p.
42. 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 // *Биорегуляция микробно-растительных систем* / Под. ред. Г.А. Иутинской, С.П. Пономаренко. – Киев : Ничлава, 2010. – 464 с.
43. Tsygankova V.A., Zayets V.N., Galkina L.A., Prizkazchikova L.P., Blume Ya.B. An unusual minor protein appearing in embryonic axis cells of haricot bean seeds following germination process stimulated by 6-methylthiouracyl // *Biopolym. Cell.* – 1998. – **14**, № 5. – P. 438–448.
44. Tsygankova V. A. Concerning the peculiarities of gene expression changes in plant leaf cells during twenty-four-hour period // *Біотехнологія.* – 2010. – **3**, № 4. – P. 86–95.
45. 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. – **3**, № 2. – P. 19–32.
46. Locker J. Analytical and preparative electrophoresis of RNA in agarose-urea // *Anal. Biochem.* – 1979. – **98**, № 2. – P. 358–367.
47. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. *Molecular cloning : A laboratory manual.* – New York : Cold Spring Harbor Lab., 1982. – 480 p.
48. *Promega protocols and applications guide.* Second edition. – USA : Promega Corporation, 1991. – 422 p.
49. Циганкова В.А., Галкін А.П., Галкіна Л.О., Саблук В.Т., Калатур К.А., Стефановська Т.Р., Пономаренко С.П. Збільшення синтезу малих регуляторних РНК з імуномодулюючими властивостями в клітинах рослин під впливом регуляторів росту // *Цукр. буряки.* – 2011. – **82**, № 4. – С. 10–12.

Надійшла 06.02.12