

На правах рукописи

СУПРУН АНДРЕЙ РОМАНОВИЧ

**РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *ARABIDOPSIS THALIANA* L. С
ПОМОЩЬЮ ЭКЗОГЕННОГО ПРИМЕНЕНИЯ *IN VITRO*
СИНТЕЗИРОВАННЫХ РНК**

1.5.6 – Биотехнология (биологические науки)

1.5.4 – Биохимия (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



ВЛАДИВОСТОК – 2022

Работа выполнена на кафедре биохимии и биотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Дальневосточный федеральный университет» и в лаборатории биотехнологии ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Костецкий Эдуард Яковлевич
Научный консультант: кандидат биологических наук,
Дубровина Александра Сергеевна
Официальные оппоненты: **Соловьев Андрей Геннадьевич**, доктор биологических наук, профессор, НИИ Физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», заведующий отделом биохимии вирусов растений
Мельникова Дарья Игоревна, кандидат биологических наук, ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии имени А.В. Жирмунского» ДВО РАН, н.с. лаборатории фармакологии
Ведущая организация: ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», г. Москва

Защита состоится «20» декабря 2022 г. в «10» часов на заседании диссертационного совета Д 99.0.064.02 на базе ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, пр-т 100-летия Владивостока, 159.

Факс: (423)2310-193. E-mail: info@biosoil.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ДВО РАН и на сайте ФГБУН «Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН: <http://www.biosoil.ru/>.

Отзывы на автореферат в двух экземплярах с заверенными подписями просим направлять по адресу: 690022, г. Владивосток, проспект 100-летия Владивостока, 159 ученому секретарю диссертационного совета.

Автореферат разослан « » октября 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Тюнин А.П.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Современная практика защиты растений и повышения урожайности, как правило, основывается на химической обработке, которая наносит вред окружающей среде и оказывает негативное воздействие на здоровье человека. Альтернативой для применения химических препаратов являются подходы по созданию трансгенных растений. Однако в литературе недостаточно информации о последствиях модификации генома, что в свою очередь порождает общественные споры о безопасности генетически модифицированных организмов и поэтому существуют законодательные ограничения на выращивание трансгенных растений во многих странах, в том числе и в России. Таким образом, развитие новых экологически чистых подходов для улучшения качеств растений без генетической модификации является актуальной задачей.

Степень разработанности темы

В последнее время появляется все больше сообщений о значительном повышении устойчивости растений к грибковой и вирусной инфекции после прямого опрыскивания растений растворами двухцепочечных РНК (дцРНК) и коротких интерферирующих РНК (киРНК), сконструированных для инактивации работы жизненно важных генов у патогенов растений (Kaldis et al. 2018; Gu et al. 2019). Недавние исследования показывают, что экзогенно примененные дцРНК и киРНК (например, путем простого опрыскивания, опрыскивания под высоким давлением, использования материалов для адгезии РНК молекул или с помощью белков-переносчиков) способны проникать в сосудистую систему растения и непосредственно в клетки растения, после чего индуцировать процесс РНК-интерференции и ингибировать экспрессию генов как у патогенов растений, так и у самого растения (Wang et al. 2016; Koch et al. 2016; Konakalla et al. 2016). Однако в настоящее время многое остается неизвестным об условиях проникновения нуклеиновых кислот в растения, и, самое важное, возможности влиять на экспрессию растительных генов.

Цели и задачи исследования

Цель работы – изучить влияние экзогенных дцРНК и киРНК на экспрессию трансгенов и эндогенных генов у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Задачи:

1. Исследовать действие экзогенных геноспецифичных дцРНК и киРНК на накопление мРНК транскриптов и белков трансгенов неомидин фосфотрансферазы II (*NPTII*) и усиленного зеленого флуоресцентного белка (*EGFP*) в трансгенных линиях *A. thaliana*.
2. Оптимизировать методику внешней обработки *A. thaliana* с целью сайленсинга трансгенов *NPTII* и *EGFP* с помощью экзогенных дцРНК и киРНК (подобрать концентрацию РНК, способ нанесения РНК, стадию развития растений, время суток для обработки и другие условия).

3. Изучить влияние внешней обработки растений растворами дцРНК и киРНК на уровень цитозинового метилирования ДНК белок-кодирующей последовательности трансгенов *NPTII* и *EGFP*.
4. Изучить влияние экзогенных дцРНК и киРНК на экспрессию генов *AtCHS*, *AtMYBL2* и *AtANAC032*, играющих важную роль в биосинтезе антоцианов *A. thaliana*.
5. Исследовать состав малых РНК в листьях *A. thaliana* после экзогенного применения *AtCHS*- и *NPTII*-кодирующих дцРНК.

Научная новизна

Впервые подробно исследовано влияние экзогенных дцРНК и киРНК на активность трансгенов в геноме *A. thaliana*. Впервые изучено влияние экзогенных синтетических дцРНК и киРНК на экспрессию важных генов, участвующих во вторичном метаболизме растений. Впервые установлено высокое значение времени суток, степени увлажнения почвы и возраста растений в момент обработки дцРНК для эффективного ингибирования экспрессии целевого гена.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты могут быть использованы для создания технологий, которые будут альтернативой применению генетически модифицированных организмов для регуляции ценных свойств растений. Также результаты диссертационной работы можно использовать для проведения теоретических и практических занятий в университетах на биологических и сельскохозяйственных факультетах.

Методология и методы диссертационного исследования

Для проведения исследований в рамках данной диссертационной работы были применены традиционные и современные методы биотехнологии, биохимии и молекулярной биологии. Выделение ДНК проводили с использованием протокола экстракции, разработанного Эхтом и др. (Echt et al., 1992) с небольшими модификациями (Kiselev et al., 2015). Выделение РНК проводили с использованием протокола экстракции с использованием цетилтриметиламмоний бромида и хлорида лития, разработанного Bekesiova и др. (Bekesiova et al., 1999) с небольшими модификациями (Dubrovina et al., 2013). Статус цитозинового метилирования был проанализирован с использованием бисульфитного секвенирования, как описано у Kiselev et al., 2013b. Для количественного анализа экспрессии генов *STS* использовали ПЦР с детекцией результатов в реальном времени (ПЦР-РВ). Экспрессию генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak et al., 2001). Для агробактериальной трансформации использовали бинарную векторную систему на основе плазмид pZP и pMP90 (Tzfira et al., 2005) и штамм агробактерий *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90. Трансгенные растения *A. thaliana* были получены методом цветочного погружения, как описано ранее (Dubrovina et al., 2015). Для анализа содержания вторичных метаболитов была проведена ВЭЖХ с УФ и масс-спектрометрией высокого разрешения как описано у Aleynova et al., 2016. Полученные данные проверены по спаренному критерию Стьюдента. Уровень значимости в 0.05

был выбран как минимальное значение статистической разницы во всех экспериментах.

Положения, выносимые на защиту

1. Экзогенное применение *NPTII*- и *EGFP*-дцРНК и *NPTII*-киРНК вызывает снижение уровня мРНК и белков соответствующих трансгенов в растениях *A. thaliana*.
2. Определены наиболее оптимальные условия для специфичного подавления активности трансгенов *NPTII* и *EGFP* в геноме растений *A. thaliana*.
3. Степень метилирования ДНК по цитозину белок-кодирующей последовательности ДНК трансгенов *NPTII* и *EGFP* увеличивается после внешней обработки растений растворами дцРНК или киРНК, в то время как при контрольной обработке водой статус метилирования существенно не изменяется.
4. Экзогенное применение *AtCHS*-кодирующих дцРНК и киРНК приводит к снижению уровня мРНК гена *AtCHS* и содержания антоцианов в *A. thaliana*. Обработка растений *AtMybL2*- и *AtANAC032*-дцРНК ингибировала экспрессию этих генов, в то время как содержание антоцианов и экспрессия *AtCHS* возрастали.
5. Экзогенные дцРНК подвергаются расщеплению до киРНК после нанесения на поверхность растений, что ведет к индукции процессов РНК-интерференции и подавлению экспрессии гена *AtCHS*.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов обеспечивается за счет использования апробированных методик, взаимодополняющих друг друга, статистической обработки результатов и воспроизводимости экспериментов. Полученные результаты полностью соответствуют записям в рабочих журналах и протоколам исследований. Результаты, научные положения и выводы подкрепляются экспериментальными данными, приведенными в виде рисунков и таблиц.

Апробация работы

Результаты работы представлены на международной конференции «Small regulatory RNAs» 14-18 апреля 2019 г., г. Тэджон, Южная Корея; на Конференции-конкурсе молодых ученых ФНЦ «Биоразнообразие» ДВО РАН 17-18 ноября 2020 г. и 16-17 ноября 2021 г., г. Владивосток

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 работ; из них 6 статей в рецензируемых научных журналах из списка ВАК РФ и 1 работа, опубликована в материалах международной научной конференции.

Структура и объём работы

Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов и списка литературы. Работа изложена на 117 страницах, иллюстрирована 30 рисунками и содержит 5 таблиц. Список литературы насчитывает 201 наименований.

Благодарности

Автор искренне благодарит научного руководителя д.б.н., проф. Костецкого Э.Я. и научного консультанта к.б.н. Дубровину А.С. за всестороннюю помощь и поддержку на всех этапах работы. Автор признателен к.б.н. Киселеву К.В., к.б.н. Алейновой О.А. и к.б.н. Огневой З.В. за помощь в получении трансгенных растений, подготовке диссертации и работе с культурами клеток растений. Также автор выражает глубокую признательность всем сотрудникам лаборатории биотехнологии ФНЦ «Биоразнообразия» ДВО РАН за поддержку на всех этапах работы. Данная работа выполнена при финансовой поддержке грантов Российского научного фонда (17-74-10083 и №19-74-10023).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы рассмотрено разнообразие некодирующих РНК и их роль в РНК-интерференции растений, а также роль дцРНК и киРНК в регуляции жизнедеятельности растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал и условия роста. В качестве модельного объекта были использованы растения Резуховидки Таля (*A. thaliana*), экотип Columbia. Семена растений дикого типа и трансгенные линии *A. thaliana* проращивали на среде Мурасиге и Скуга (Murashige and Skoog, 1962, MS) в чашках Петри. Среда для трансгенных растений содержала антибиотик канамицин (Km) 50 мкг/мл. Через неделю проростки растений высаживали в горшки, содержащие 100 г коммерчески доступного универсального грунта для растений (Фаско, Россия) и выращивали в климатической камере при +22°C (Sanyo MLR-352, Panasonic, Осака, Япония), с фотопериодом 16 часов день и 8 часов ночь при интенсивности света ~ 120 мкмоль м⁻²с⁻¹. После обработки растений растворами дцРНК или киРНК растения инкубировали в течение 7 или 14 дней в контрольных условиях, которые являются стандартными для *A. thaliana* (+22°C, 16 ч дневного светового периода) или в условиях, которые индуцируют накопление антоцианов (+7°C, 23 часа дневного светового периода) без дополнительного полива.

Получение трансгенных растений A. thaliana. Для получения EGFP- и NPTII-трансгенных растений *A. thaliana* использовали метод агробактериальной трансформации (штамм агробактерий *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90) с использованием бинарной векторной конструкции на основе плазмиды pZP-RCS2-EGFP-NPTII (Numata et al., 2014). Растения *A. thaliana* были трансформированы методом цветочного погружения (Zhang et al., 2006), при котором соцветия погружают в суспензию агробактерий, несущих векторную конструкцию с генами NPTII и EGFP.

Синтез одРНК, киРНК, дцРНК. ДцРНК генов EGFP, NPTII, AtCHS, AtMYBL2 и AtANAC032 синтезировали с использованием набора MEGAscript RNAi (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Промоторная последовательность T7 была введена как в 5', так и в 3' концы EGFP и NPTII

с помощью ПЦР. Полученные продукты ПЦР использовались в качестве матриц для транскрипции *in vitro* и синтеза дцРНК в соответствии с протоколом производителя.

NPTII- и *AtCHS*-кодирующие олигонуклеотидные последовательности синтезировали *in vitro*, модифицировали и очищали методом препаративной ВЭЖХ (Синтол, Москва, Россия). Для наружного применения синтезированные РНК разводили в воде, свободной от нуклеаз, до конечной концентрации 50 пмоль/мкл. Для образования дуплексов киРНК равные объемы одноцепочечных РНК (одРНК) разбавляли до концентрации 100 пмоль/мкл, смешивали и отжигали при +90°C в течение 1 мин с использованием твердотельного термостата «Гном» (ДНК Технология, Москва, Россия). Затем смесь медленно охлаждали до комнатной температуры. Конечная концентрация олигонуклеотидов РНК составляла 50 пмоль/мкл.

Обработка растений растворами РНК и подбор условий для эффективного воздействия дцРНК и киРНК. Для анализа эффективности различных способов нанесения дцРНК на поверхность растений применяли: растирание мягкими кисточками, распыление с использованием пульверизатора, инфльтрация шприцом, механическая инокуляция с добавлением карбида кремния, инъекция стебля с использованием шприца и нанесение капель на поверхность листьев автоматической пипеткой. В последующих экспериментах растворы дцРНК и киРНК были нанесены на поверхность растений *A. thaliana* с помощью индивидуальных мягких кисточек. Для оценки эффективности воздействия экзогенных дцРНК растения *A. thaliana* обрабатывались в различное время суток: в 9:00, 15:00, 21:00 и 3:00 часов. Во всех последующих экспериментах все процедуры, связанные с обработкой растений, проводились в 21:00, поскольку было показано, что обработка в это время имела наибольшую эффективность в отношении ингибирования экспрессии трансгенов.

При исследовании влияния абиотических стрессов на эффективность экзогенных дцРНК использовались четырехнедельные растения. Для имитации высокотемпературного стресса, растения помещались в климатическую камеру (КС-200 СПУ, Смоленск, Россия) после обработки синтетической дцРНК, при температуре +38 °С на 2 часа, после чего растения культивировали при +22 °С. Для оценки влияния низкотемпературного стресса на эффективность внешнего воздействия синтетической дцРНК обработанные растения помещались в климатическую камеру (КС-200 СПУ, Смоленск, Россия) при температуре +5°C на 2 часа, после чего растения культивировали в стандартных условиях. Солевой стресс индуцировали после обработки дцРНК с помощью однократного полива растений раствором NaCl в концентрации 200 мМ в течение 2 часов. Для оценки влияния влажности почвы на эффективность обработки растения не поливали в течение 4 недель после высадки в грунт (условия засухи, влажность почвы 60 ±5%) или были хорошо политы за 1 день до обработки дцРНК (полив, влажность почвы 80 ±5%).

Выделение РНК, обратная транскрипция, количественный ПЦР с детекцией результатов в реальном времени (ПЦР РВ). Для выделения нуклеиновых кислот использовали один взрослый лист четырехнедельного растения *A. thaliana*. РНК выделяли из листьев *A. thaliana* до обработки и через 1, 7 и 14 дней после обработки синтетическими дцРНК или киРНК. Тотальную РНК выделяли по методике на основе цетилтриметиламмония бромида (СТАВ) (Kiselev et al. 2013) и обрабатывали ДНКазой (Силекс, Москва, Россия). Используя 1.5 мкг тотальной РНК, получали кДНК с помощью набора для обратной транскрипции (Силекс, Россия). Количественный ПЦР с детекцией результатов в реальном времени (ПЦР РВ) проводили с использованием флуоресцентного красителя EvaGreen (Biotium, Хейворд, США), используя набор реагентов ПЦР-комплект для ПЦР в реальном времени в соответствии с рекомендациями производителя (Синтол, Россия) как описано в работе (Dubrovina et al., 2015). В качестве релевантных эталонных генов для ПЦР РВ были выбраны два гена *A. thaliana EF-1 α* (номер Генбанк XM_002864638) *GAPDH* (номер Генбанк NM_111283) и *UBQ* (номер Генбанк NM_001084884) (Czechowski et al., 2005). Измерение экспрессии генов для каждого эксперимента было выполнено в трех биологических повторах. Обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения RealTime_PCR v.7.3 («ДНК Технология», Россия), обсчет по методу $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001). Данные ПЦР РВ были получены на кДНК из трех независимых экспериментов.

Лазерная сканирующая микроскопия. Лазерную сканирующую микроскопию четырехнедельных листьев растений *A. thaliana* проводили с использованием конфокального микроскопа Zeiss LSM 780 (Оберкохен, Германия). Длина волны возбуждения аргонового лазера 488 нм. Излучение EGFP регистрировалось с использованием полосового фильтра 520–525 нм. Для количественной оценки флуоресценции EGFP 10 Z-стеков были захвачены для каждого листа (5 Z-стеков сверху и 5 Z-стеков снизу листа). Z-стеки обработаны с использованием программного обеспечения ImageJ 1.51w (Schindelin et al., 2012; Schneider C. et al., 2012). Каждый Z-стек импортирован в ImageJ и спроецирован на Z проекцию с использованием суммы проекций. Проецируемые изображения достигли порога, используя метод Оцу (Otsu et al., 1979), а также измеряли площадь и среднюю флуоресценцию переднего плана (сигнал EGFP) и фона вдоль всего изображения.

Выделение белков и вестерн-блоттинг. Белки выделяли из 30 мг замороженной ткани листа *A. thaliana* путем измельчения в 300 мкл 0.1 М натрий фосфатного буфера pH 8.0 с 4% додецилсульфатом натрия с последующей ультразвуковой обработкой в течение 30 секунд при максимальной амплитуде, используя q55 qsonica sonicator (Qsonica LLC, Ньютаун, США). После центрифугирования (16000 g, 20 минут при +4 °C) концентрацию белка определяли, используя набор Qubit и флуорометр Qubit 2.0 (Invitrogen, Карлсбад США). 5 мкг белкового экстракта разделяли

методом SDS-PAGE в 12% полиакриламидном геле с использованием электрофорезной камеры Helicon VE-10 (Helicon, Москва, Россия) при 200 V. Далее белки были перенесены на дифторид поливинилиденную (PVDF) мембрану. После блокировки в течение 1 часа в PBS (1.7 mM KH_2PO_4 , 5.2 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl) с 2.5% обезжиренным сухим молоком при комнатной температуре мембраны инкубировали в течение ночи при температуре +5°C с анти-GFP антителами (ab6556 Abcam, Кембридж, Великобритания) в разведении 1:1000. Следующие три промывки осуществляли с использованием PBS, содержащим 0.1% Tween 20 и 2.5% обезжиренное сухого молока, при комнатной температуре. Мембрану инкубировали с вторичными антителами (ab6112 Abcam, США) в разведении 1: 2000. Через 1 час после трех промывок мембрану для визуализации обрабатывали 40 мл водного раствора, содержащего 10 мг 3,3-диаминобензидина, 4 мл этанола, 2 мл 1 M Tris-HCl (pH 7.6) и 25 мкл H_2O_2 .

Выделение ДНК и бисульфитное секвенирование. Выделение ДНК из растений *A. thaliana* проводили с использованием протокола экстракции, разработанного Эхтом и др. с небольшими модификациями (Echt et al., 1992; Kiselev et al., 2015). Далее бисульфитное секвенирование проводили как описано Ogneva et al., 2016. После бисульфитной конверсии ДНК фрагменты 352 пн *NPTII* и 349 пн *EGFP* были амплифицированы с использованием праймеров, приведенных в табл. 1. Количество цитозин-тимин переходов в контрольных ПЦР продуктах было больше 95%, что свидетельствовало о хорошем качестве конверсии. Далее было секвенировано 18 клонов для каждой области ДНК из двух биологических повторов (по 9 клонов на каждое отдельное растение).

Детекция EGFP-киРНК методом stem-loop ПЦР РВ и секвенирование ДНК. Последовательности *EGFP-киРНК* были получены из базы данных малых интерферирующих РНК NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/tnai>) и на основе праймера для Stem-Loop конструкции на *EGFP-киРНК* с типичной структурой для вектора pEGFP-N1. Для выделения РНК с низкой молекулярной массой сначала выделяли тотальную РНК, используя протокол на основе СТАВ (Kiselev et al., 2013). Затем, низкомолекулярную фракцию РНК осаждали (Peng et al., 2015). Реакцию ОТ-ПЦР проводили с 0.2 мкл праймеров *EGFP-киРНК stem-loop* (100 мкМ) и обратной транскриптазой ThermoScript (Invitrogen, Life Technologies, США) (Varkonyi-Gasic et al., 2007). Целевую *EGFP-киРНК* амплифицировали с помощью ПЦР (Kiselev et al., 2017).

Анализ содержания антоцианов. Идентификацию всех антоцианов проводили с использованием аналитической системы ВЭЖХ 1260 Infinity (Agilent Technologies, Санта-Клара, США), оснащенной системой масс-детекции Bruker HCT ultra PTM Discovery System (Bruker Daltonik GmbH, Бремен, Германия) с источником ионизации электрораспылением (ESI). Для количественного определения всех антоцианов использовали аналитическую систему ВЭЖХ LC-20AD XR (Shimadzu, Киото, Япония).

Секвенирование малых РНК и биоинформатический анализ. РНК готовилась к секвенированию при помощи набора Qiagen Small RNA Sample Prep (Qiagen). После контроля качества и оценки количества ДНК пул библиотек был секвенирован на приборе Illumina NovaSeq 6000. Было получено 526 174 120 прочтений. В прочтениях, полученных в результате высокопроизводительного секвенирования, с помощью программы bbdutk были обрезаны адапторные последовательности (AACTGTAGGCACCATCAAT, AGATCGGAAGAGCACACGT) и убраны низкокачественные прочтения и прочтения длиной меньше 17 и больше 30 нуклеотидов (bbduk parameters: minlen=17 maxlen=30 k=17 hdist=1 ktrim=r maq=20 entropy=0). Используя программу Bowtie1 (Langmead et al., 2009), из анализа были исключены прочтения, выравненные на последовательности рибосомальной РНК и хлоропластной ДНК, и прочтения, несоответствующие геномным последовательностям *A. thaliana* TAIR10 (за исключением гена *NPTII*) (Lamesch et al., 2012). Затем был проанализирован состав малых РНК, выравненных на последовательности *AtCHS* и *NPT2*.

Статистический анализ. Каждый представленный эксперимент проводили в трех биологических повторах. Статистический анализ был проведен с использованием программы Statistica 10.0 program (StatSoft Inc, 143 Boston, USA). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка (С.О.) и были проверены парным *t*-тестом Стьюдента. Уровень 0.05 был выбран в качестве точки минимальной статистической значимости во всех анализах.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Трансгенные EGFP- и NPTII-сверхэкспрессирующие линии растений A. thaliana. В ходе агробактериальной трансформации методом цветочного погружения были получены гомозиготные трансгенные линии растений *A. thaliana*, независимо трансформированные трансгенами *NPTII* и *EGFP* (линии L1, L2, L3) и две гомозиготные трансгенные линии растений *A. thaliana* (линии КА0-1 и КА0-2), независимо трансформированные только *NPTII*. Линии с наиболее высоким уровнем экспрессии генов *EGFP* и *NPTII* были выбраны для дальнейших экспериментов.

Подавление экспрессии трансгенов NPTII и EGFP в растениях A. thaliana с помощью экзогенных дцРНК и транзитивность сайленсинга. Данные ПЦР РВ показали, что количество мРНК гена *NPTII* было значительно ниже у растений, обработанных *NPTII*-дцРНК (рис. 1а). Что касается экспрессии *EGFP*, то в растениях, обработанных *EGFP*-дцРНК, количество мРНК трансгена *EGFP* также существенно снижалась, в то время как обработка водой увеличивала, либо незначительно снижала экспрессию *EGFP* (рис. 1б).

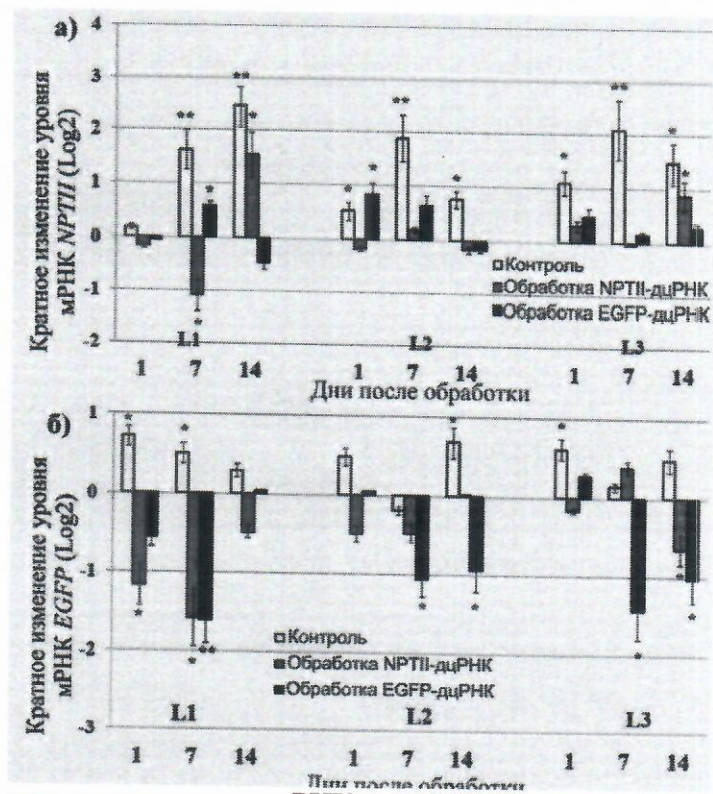


Рис. 1. Кратное изменение уровня мРНК генов *NPTII* (а) и *EGFP* (б) у *A. thaliana* после внешнего применения воды, *NPTII*-дцРНК и *EGFP*-дцРНК в трех независимых трансгенных линиях (L1, L2, L3). Уровень мРНК *NPTII* и *EGFP* оценивали на 1, 7 и 14 день после обработки относительного уровня экспрессии *NPTII* и *EGFP* в том же растении перед обработкой. Листья *A. thaliana* обрабатывали дцРНК в концентрации 0.35 мкг/мл и водой (по 100 мкл). Значения относительного уровня мРНК *NPTII* и *EGFP* представлены в виде кратного изменения (\log_2). Данные ПЦР РВ представлены как среднее значение \pm С.О. *, ** – значительно отличается от растений до обработки при $p \leq 0.05$ и 0.01 на основании *t*-теста Стьюдента, соответственно.

Анализируя экспрессию *NPTII* после обработки дцРНК, мы отметили, что уровень экспрессии *NPTII* был снижен у растений *A. thaliana*, обработанных *EGFP*-дцРНК (Рис. 1а), а уровень экспрессии *EGFP* был понижен у растений, обработанных *NPTII*-дцРНК (Рис. 1б). Снижение уровня мРНК гена *NPTII* путем воздействия *EGFP*-дцРНК, и наоборот, можно объяснить усилением транзитивности сайленсинга, т.е. сигнал сайленсинга от *EGFP*-дцРНК переходит на ген *NPTII* и, наоборот, от *NPTII*-дцРНК переходит на трансген *EGFP*, из-за появления дополнительных киРНК, способных узнавать общую мРНК генов *NPTII* и *EGFP*. Для подтверждения данного явления мы выяснили, накапливаются ли подробные транскрипты в растениях *A. thaliana* методом ОТ-ПЦР.

Показано, что продуктов амплификации не было в кДНК, полученной для растений дикого типа. Однако продукт амплификации размером 2–2.5 kb был обнаружен в кДНК трансгенных растений и в положительном контроле (плазмиды рZP-RCS2) (рис. 2). Секвенирование ДНК показало, что продукт амплификации размером 2.276 kb содержал кодирующие последовательности двух трансгенов *NPTII* и *EGFP*, а также их регуляторные элементы. Показано, что количество таких длинных “read-through” транскриптов в

трансгенных растениях было снижено после обработки растений как *NPTII*-дцРНК, так и *EGFP*-дцРНК, но не после обработки водой (рис. 2).

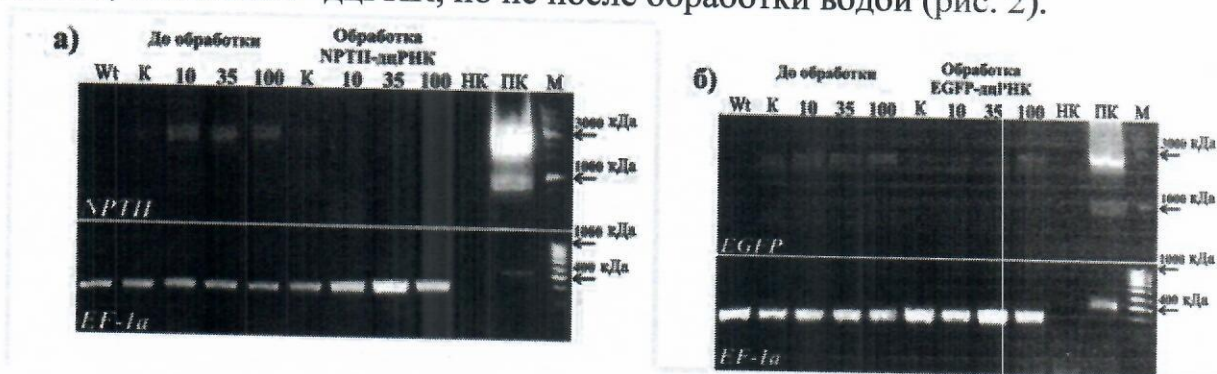


Рис. 2. Детекция “read-through” транскриптов, включающих в себя последовательности трансгенов *EGFP* и *NPTII* после обработки растений *NPTII*-дцРНК (а) или *EGFP*-дцРНК (б). Wt – растения *A. thaliana* без обработки; К – контрольная обработка *NPTII*- и *EGFP*-трансгенных растений стерильной фильтрованной водой; 10, 35, 100 – обработка трансгенных дцРНК, разведенной в воде до концентраций 0.1, 0.35 и 1 мкг/мкл (100 мкл на растение). М – низкомолекулярная ДНК-лестница; НК – отрицательный контроль (смесь реактивов для ПЦР без добавления кДНК); ПК – положительный контроль (плазмида pZP-RCS2).

Подавление экспрессии трансгена NPTII в растениях A. thaliana с помощью экзогенных киРНК. Далее была изучена возможность применения синтетических одРНК (R1-s, R1-a, R1-Me-s, R1-Me-a, R3-s, R3-a, R3-Me-s, R3-Me-a) и киРНК-дуплексов (R1-s+a, R1-Me-s+a, R3-s+a и R3-Me-s+a) для воздействия на уровень транскриптов *NPTII* в *A. thaliana*. Анализ ПЦР РВ показал, что уровень транскриптов *NPTII* был значительно снижен на 1 день после обработки растений *A. thaliana* киРНК R1-s+a (рис. 3а). В то время как применение одРНК R1-s и R1-a снижало количество транскриптов гена *NPTII* на 1 день после обработки, эти отличия не были статистически значимыми (рис. 3а). На 7 день после обработки уровень транскрипта гена *NPTII* существенно не изменился под воздействием киРНК R1-s+a или одРНК R1-s и R1-a, в то время как количество транскриптов *NPTII* заметно увеличилось через 7 дней после обработки водой в контроле (рис. 3а). Применение метилированного дуплекса киРНК R1-Me-s+a привело к значительному подавлению *NPTII* как на 1, так и на 7 день после обработки по сравнению с экспрессией *NPTII* в этих же растениях перед обработкой (рис. 3б). Обработка метилированными одРНК (R1-Me-s или R1-Me-a) также привела к заметному снижению уровня экспрессии *NPTII*, но только на 1 день в линии КА0-1 и на 7 день в КА0-2 (рис. 3б).

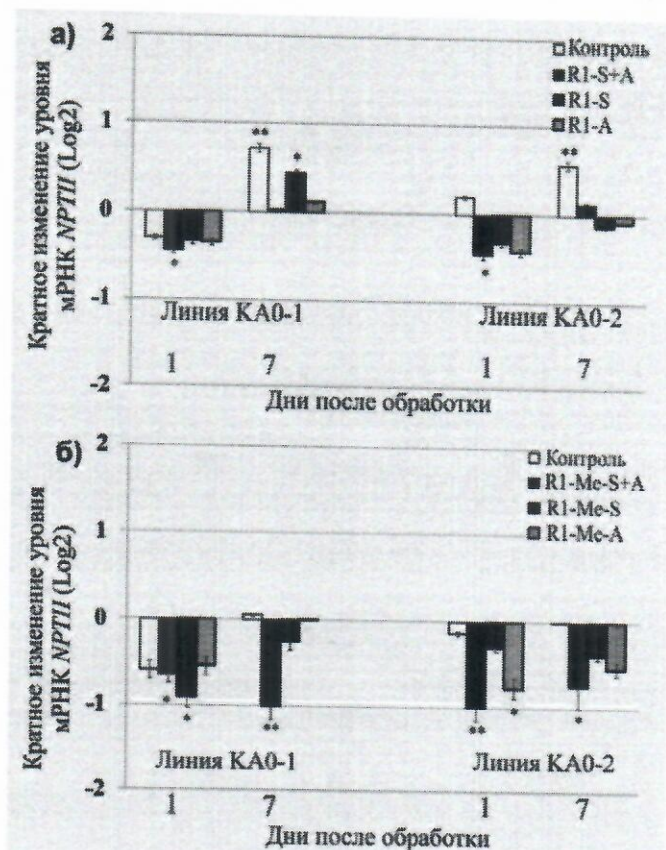


Рис. 3. Кратное изменение уровня мРНК *NPTII* в *NPTII*-трансгенных линиях *A. thaliana* КА0-1 и КА0-2 в ответ на внешнее применение воды и синтетических *NPTII*-кодирующих R1 одРНК и R1 киРНК относительно уровня транскриптов *NPTII* до обработки. а) Обработка водой (контроль), неметилованными R1 одРНК (R1-S, R1-A) и неметилованными R1 киРНК (R1-S+A). б) Обработка водой (контроль), метилированными R1Me одРНК (R1-Me-S, R1-Me-A) и метелированными R1Me киРНК (R1-Me-S+A). одРНК и киРНК разводили в воде до концентрации 0.35 мкг/мкл (100 мкл на растение) и наносили на поверхность листьев четырехнедельных *A. thaliana* линий КА0-1 и КА0-2 стерильными мягкими кисточками. Тотальная РНК была выделена через 1 и 7 дней после обработки. Значения относительного уровня мРНК *NPTII* и *EGFP* представлены в виде кратного изменения (\log_2). Данные ПЦР РВ представлены как среднее значение \pm С.О. *, ** – значительно отличается от растений до обработки при $p \leq 0.05$ и 0.01 на основании *t*-теста Стьюдента, соответственно.

Применение R3-s+a привело к значительному снижению количества мРНК гена *NPTII* в первый день после обработки в линии КА0-1 (рис. 4а). Сходным образом действовали R3 одРНК – чаще в пробах наблюдалось снижение количества транскриптов после применения R3 одРНК, но эти значения достоверно не отличались от значений, полученных до обработки малыми РНК (рис. 4а). Использование метилированной R3-Me-s+a киРНК и метилированной одРНК R3-Me-s приводило к значительному снижению экспрессии *NPTII* в линии КА0-2 *A. thaliana* на 1 и 7 день после обработки (рис. 4б). Таким образом, метилированные R1 и R3 олигонуклеотиды показали лучший результат, по сравнению с неметилованными.

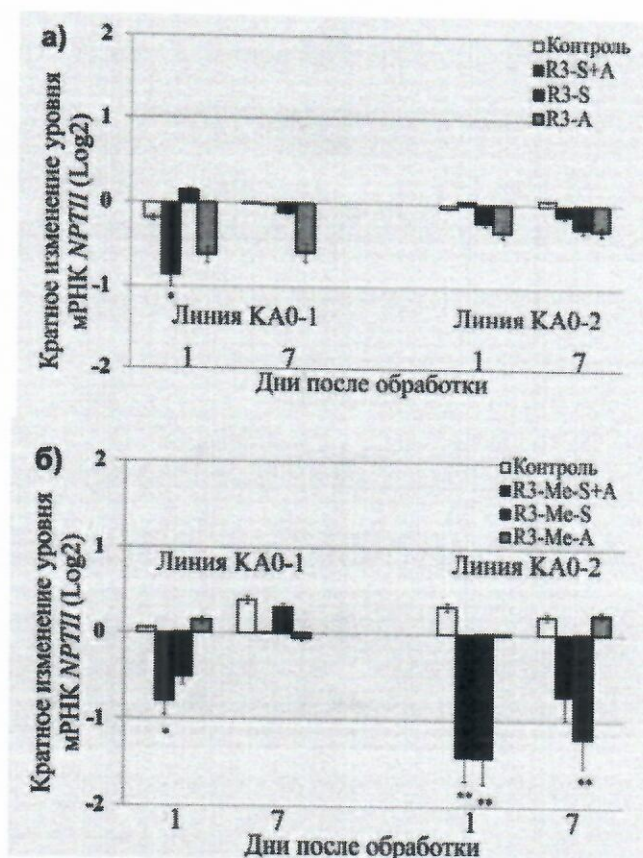


Рис. 4. Кратное изменение уровня мРНК *NPTII* в *NPTII*-трансгенных линиях *A. thaliana* КА0-1 и КА0-2 в ответ на внешнее применение воды и синтетических *NPTII*-кодирующих R3 одРНК и R3 киРНК относительно уровня транскриптов *NPTII* до обработки. а) Обработка водой (контроль), неметилированными R3 одРНК (R3-S, R3-A) и неметилированными R3 киРНК (R3-S+A). б) Обработка водой (контроль), метилированными R3Me одРНК (R3-Me-S, R3-Me-A) и метилированными R3Me киРНК (R3-Me-S+A). одРНК и киРНК разводили в воде до концентрации 0.35 мкг/мкл (100 мкл на растение) и наносили на поверхность листьев четырехнедельных растений *A. thaliana* линий КА0-1 и КА0-2 стерильными мягкими кисточками. Тотальная РНК была выделена через 1 и 7 дней после обработки. Значения относительного уровня мРНК *NPTII* и *EGFP* представлены в виде кратного изменения (log₂). Данные ПЦР РВ представлены как среднее значение ± С.О. *, ** – значительно отличается от растений до обработки при $p \leq 0.05$ и 0.01 на основании *t*-теста Стьюдента, соответственно.

Оптимизация условий и способа обработки растений водными растворами дцРНК и киРНК. Вначале определили наиболее эффективную концентрацию дцРНК. Для этого мы обработали трансгенные растения *A. thaliana*, содержащие трансгены *NPTII* и *EGFP*, растворами *NPTII*- и *EGFP*-дцРНК в концентрациях 0.1, 0.35 и 1 мкг/мкл (10, 35 и 100 мкг дцРНК на растение). Через 7 дней после обработки был проанализирован уровень экспрессии трансгенов *NPTII* и *EGFP*. Установлено, что использование 35 мкг дцРНК на растение (100 мкл с концентрацией 0.35 мкг/мкл) позволяет достигнуть наибольшей эффективности подавления трансгенов. В последующих экспериментах была использована данная концентрация экзогенных РНК. Для определения оптимальной концентрации киРНК для РНК-интерференции трансгена *NPTII* в растениях *A. thaliana* были использованы следующие концентрации киРНК R3-Me: 100 мкл на растение

с концентрацией 0.07, 0.18, 0.35 и 0.7 мкг/мкл (7, 18, 35, 70 мкг на растение). Контрольные растения обрабатывали стерильной водой. Концентрации 0.35 и 0.7 мкг/мкл оказывали самое сильное ингибирующее влияние на экспрессию трансгена *NPTII*.

Далее было изучено влияние возраста растений, времени суток в момент обработки, способа нанесения дцРНК и абиотических стрессовых факторов на эффективность сайленсинга трансгена *NPTII*. Данные ПЦР РВ показали снижение количества транскриптов *NPTII* в растениях линий КА0-1 и КА0-2 на 1 и 7 день после нанесения дцРНК, но наиболее сильное снижение экспрессии трансгена наблюдалось после обработки четырехнедельные растений. Для оценки суточной вариации эффективности воздействия экзогенных дцРНК четырехнедельные растения *A. thaliana* обрабатывались в 9:00, 15:00, 21:00 и 3:00 часов. Наиболее яркий эффект снижения количества мРНК *NPTII* в обеих линиях был отмечен при обработке растений *NPTII*-дцРНК в 21:00 и 3:00. Исходя из эффективности сайленсинга и удобства проведения последующих экспериментов, в дальнейшей работе обработка растений проводилась в 21:00. Также было проведено сравнение эффективности различных способов нанесения дцРНК на поверхность листьев растений. На поверхность листьев четырехнедельных растений *NPTII*-дцРНК наносилась следующими способами: растирание индивидуальными мягкими кисточками, распыление с использованием пульверизатора, инфильтрация шприцом, механическая инокуляция с добавлением карбида кремния, инъекция в верхнюю сторону листа с использованием шприца и нанесение капель на поверхность листьев автоматической пипеткой. Наиболее эффективными способами нанесения дцРНК на растения были распыление и нанесение дцРНК с помощью кисти и автоматической пипетки. Поскольку распыление увеличивает вероятность контаминации дцРНК соседних горшков и рабочего помещения, было решено в дальнейшей работе использовать растирание дцРНК индивидуальными мягкими кисточками. Для исследования влияния различных абиотических стрессовых факторов на эффективность внешнего воздействия синтетической дцРНК была проведена оценка влияния пониженной и повышенной температуры, а также условий высокой засоленности почвы и дефицита воды, на подавление экспрессии трансгена *NPTII*. Холодовой стресс снизил эффективность подавления экспрессии целевого экзогенными дцРНК в линии КА0-1, в то время как в линии КА0-2, наблюдалось повышение эффективности подавления экспрессии *NPTII* через 1 день. Воздействие высокотемпературного стресса на растения в течении двух часов после нанесения на поверхность листьев *NPTII*-дцРНК оказало отрицательное влияние на эффективность дцРНК-индуцированного подавления экспрессии гена *NPTII*. Солевой стресс не влиял на эффективность *NPTII* дцРНК-индуцированного подавления экспрессии *NPTII* через 1 и 7 дней после обработки. Более интересные результаты были получены при изучении влияния влажности почвы на эффективность применения *NPTII*-дцРНК. Данные ПЦР РВ указывают на то, что применение

NPTII-дцРНК вскоре после полива привело к более низкой эффективности дцРНК-индуцированного сайленсинга трансгена *NPTII*.

Анализ цитозинового метилирования ДНК трансгенов *NPTII* и *EGFP* в ответ на применение экзогенных дцРНК и киРНК. Показано, что степень цитозинового метилирования ДНК области трансгенов *NPTII*, соответствующей применяемым дцРНК, в трансгенной линии L1 *A. thaliana* значительно увеличилась на 7 день после обработки растений *NPTII*-дцРНК и *EGFP*-дцРНК (рис. 5). При этом уровень цитозинового метилирования ДНК генов *NPTII* и *EGFP* в контрольных растениях, обработанных водой, достоверно не увеличивался (рис. 5).

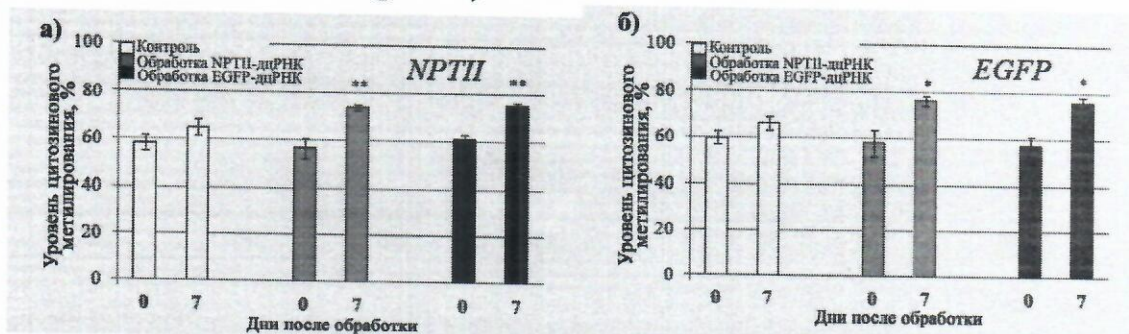


Рис. 5. Анализ уровня метилирования ДНК по цитозину генов *NPTII* и *EGFP* в трансгенной линии L1 *A. thaliana* до обработки и через 7 дней после внешнего применения *NPTII*- и *EGFP*-дцРНК или стерильной воды (контроль) с помощью бисульфитного секвенирования (а, б). Данные представлены как среднее значение \pm С.О. *, ** – значительно отличается от растений до обработки при $p \leq 0.05$ и 0.01 на основании *t*-теста Стьюдента, соответственно. Общее количество цитозинов было взято за 100%.

Далее, мы проверили, может ли применение *NPTII*-кодирующих киРНК R1-Me и R3-Me привести к индукции и распространению метилирования ДНК по цитозину. Показано, что степень метилирования ДНК трансгена *NPTII* достоверно увеличивалась после обработки киРНК (рис. 6).

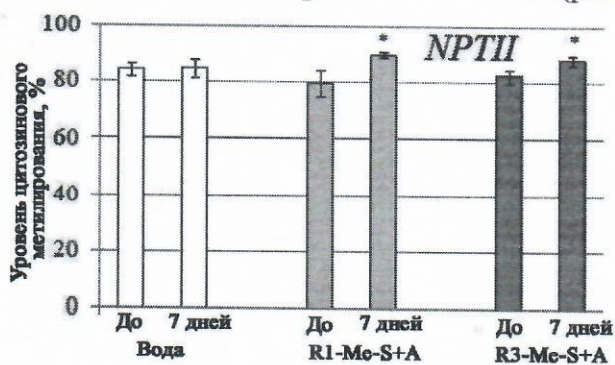


Рис. 6. Анализ уровня цитозинового метилирования ДНК гена *NPTII* в *NPTII*-трансгенной линии *A. thaliana* KA0-2 до обработки и через 7 дней после внешнего применения *NPTII*-киРНК R1-Me-S+A, R3-Me-S+A или стерильной фильтрованной воды с помощью бисульфитного секвенирования. Данные представлены как среднее значение \pm С.О. Статистические различия при * – $p < 0.05$ по критерию Стьюдента от значения метилирования цитозинов до обработки. Общее количество цитозинов было взято за 100%.

Регуляция экспрессии генов биосинтеза антоцианов у *A. thaliana* посредством экзогенных дцРНК или киРНК. Для того чтобы подтвердить

предположение, что применение экзогенных дцРНК или киРНК может подавлять экспрессию собственных генов растений, мы решили проанализировать влияние *AtCHS*-дцРНК, *MYBL2*-дцРНК и *ANAC032*-дцРНК на количество транскриптов мРНК гена хаконосинтазы *AtCHS* и генов транскрипционных факторов, участвующих в негативной регуляции биосинтеза антоцианов *AtMYBL2*, и *AtANAC032*.

Для стимулирования накопления антоцианов растения *A. thaliana* были разделены на две группы. В первой группе растения находились в стандартных условиях (+22 °С, 16/8 часов день/ночь), растения во второй группе находились в условиях холодого стресса и постоянного освещения, индуцирующих накопление антоцианов (+7 °С, 23/1 часов день/ночь). С помощью ПЦР РВ было показано, что культивирование *A. thaliana* в условиях, индуцирующих накопление антоцианов, приводило к значительному увеличению уровня мРНК гена *AtCHS* в контрольных растениях, обработанных водой и *NPTII*-дцРНК как на 2, так и на 7 день эксперимента (рис. 7). Однако, увеличения уровня мРНК гена *AtCHS* не наблюдалось после обработки растений *AtCHS*-дцРНК, как в стандартных условиях, так и в условиях, индуцирующих накопление антоцианов через 2 и 7 дней после внешнего воздействия (рис. 7б). Результаты ВЭЖХ с тандемной масс-спектрометрией показали, что растения, обработанные *AtCHS*-дцРНК, содержали в 1.7-2 раза меньше антоцианов в условиях, индуцирующих накопление антоцианов, по сравнению с контрольными растениями (рис. 7в).

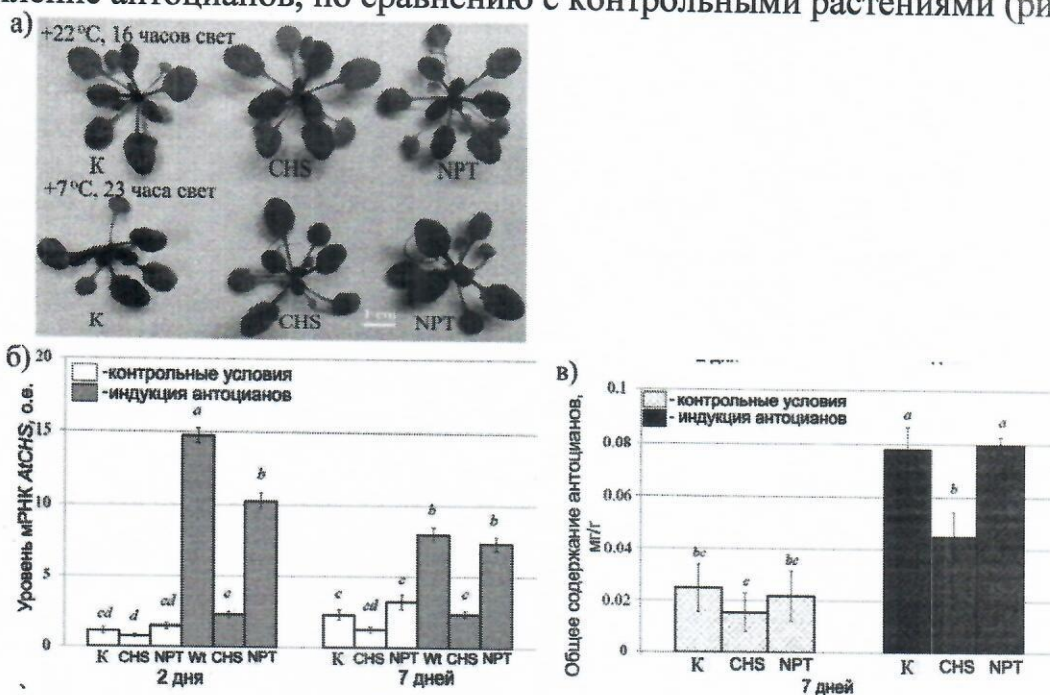


Рис. 7. Влияние экзогенных *AtCHS*- и *NPTII*-кодирующих дцРНК на уровень мРНК гена *AtCHS* и общее содержание антоцианов в *A. thaliana*. (а) Внешний вид растений *A. thaliana*, выращенных в контрольных условиях (+22 °С, 16 ч световой день) и в условиях, индуцирующих накопление антоцианов (+7 °С, 23 ч световой день) в течении 7 дней после обработки стерильной водой или дцРНК; (б) Количественная оценка уровня мРНК гена *AtCHS* в листьях *A. thaliana*, обработанных водой или синтетическими дцРНК на 2 и 7 день после обработки; (в) Количественная оценка общего содержания антоцианов в листьях *A. thaliana*, выращенных в контрольных условиях и в условиях индуцирующих

накопление антоцианов на 7 день после обработки дцРНК. К – растения *A. thaliana*, обработанные стерильной водой; CHS – растения *A. thaliana*, обработанные *AtCHS*-дцРНК; NPT – растения *A. thaliana*, обработанные *NPTII*-дцРНК. Данные ПЦР РВ представлены в виде среднего значения \pm С.О. Значения с одной и той же буквой статистически не отличались при использовании *t*-критерия Стьюдента. Значение $p < 0.05$ считалось статистически значимым.

Далее, была проведена оценка влияния *AtCHS*-киРНК на экспрессию гена *AtCHS* и содержание антоцианов в листьях *A. thaliana*. Было показано значительное снижение уровня мРНК гена *AtCHS* в растениях, обработанных *AtCHS*-киРНК, по сравнению с контрольными растениями, обработанными водой и *NPTII*-киРНК, в условиях индуцирующих накопление антоцианов на 2 день после обработки. ВЭЖХ анализ антоцианов растений, культивируемых в течение 7 дней после обработки киРНК в условиях индукции антоцианов, показал, что воздействие *AtCHS*-киРНК привело к снижению количества антоцианов.

Также было установлено, что внешняя обработка растений *AtMYBL2*-дцРНК приводила к значительному снижению уровня мРНК гена *AtMYBL2* как в стандартных условиях, так и условиях, индуцирующих накопление антоцианов. Экзогенное применение *AtANAC032*-дцРНК также приводило к выраженному снижению уровня мРНК *AtANAC032*, особенно в условиях, индуцирующих накопление антоцианов. Дальнейший анализ выявил достоверное повышение экспрессии гена *AtCHS* после применения *MYBL2*-дцРНК и *ANAC032*-дцРНК. Этот факт указывает на то, что именно обработка *MYBL2*-дцРНК и *ANAC032*-дцРНК оказывает специфическое действие на экспрессию генов транскрипционных факторов, блокирующих активность гена *AtCHS*, что в свою очередь положительно сказывается на экспрессии *AtCHS*, а также на содержании антоцианов.

Анализ фракции малых РНК в растениях *A. thaliana* после экзогенного применения *AtCHS*-кодирующих дцРНК. С помощью масштабного секвенирования фракции малых РНК по технологии Illumina и последующего биоинформатического анализа установлено, что применение как *AtCHS*-дцРНК, так и *NPTII*-дцРНК, привело к появлению большого количества *AtCHS*- или *NPTII*-специфичных малых РНК, что не было отмечено после контрольных обработок водой. Анализ распределения всей популяции малых РНК по длинам показал, что во всех образцах содержание малых РНК длиной 21, 23 и 24 нуклеотида значительно превышало содержание других вариантов. Применение экзогенных *AtCHS*-дцРНК привело к значительному увеличению уровня 21-нуклеотидных малых РНК, в то время как содержание малых РНК длиной 23 и 24 нуклеотида, было значительно снижено по сравнению с другими видами обработки. В *A. thaliana*, обработанном соответствующими дцРНК, детектировано 1,75% специфичных к *AtCHS* малых РНК и 0,85% специфичных к *NPTII* малых РНК среди всех полученных считываний после предобработки, в то время как в контрольных растениях, обработанных водой, таких последовательностей не было.

ОБСУЖДЕНИЕ

Открытие феномена РНК-интерференции привело к развитию генной инженерии и появлению новых инструментов для улучшения свойств сельскохозяйственных культур, борьбы с болезнями и вредителями растений. В настоящее время наиболее распространенный подход, основанный на явлении РНК-интерференции, включает этап получения трансгенных растений (Protiva et al., 2020). Однако подходы, основанные на генетической трансформации растений, вызывают общественные дискуссии и научную неопределенность в отношении последствий генетических модификаций. Таким образом, разработка новых технологий, основанных на внешней обработке растений растворами РНК с последующим эффектом специфичного подавления экспрессии целевых генов, является важной задачей для биотехнологии.

В нашем исследовании мы проанализировали эффект применяемого количества киРНК и дцРНК. Показано, что 35 мкг на четырехнедельное растение *A. thaliana* является наиболее оптимальным из-за сочетания эффективности и более низкой стоимости синтеза. При анализе влияния возраста растений *A. thaliana* на эффективность подавления экспрессии *NPTII* было показано, что внешнее воздействие *NPTII*-дцРНК приводит к наиболее сильному снижению экспрессии *NPTII* после обработки четырехнедельных растений, в то время как у двух- и шестинедельных растений данный эффект был менее ярким. Вероятно, низкая эффективность внешнего воздействия на двухнедельные растения связана с негативным воздействием большого количества дцРНК на малую площадь поверхности листьев. Также нами было отмечено, что более сильное подавление *NPTII* наблюдается после обработки растений в вечернее или ночное время. Данные результаты указывают на возможную значимость суточных колебаний в активности транспирации и фотосинтеза для активного поглощения дцРНК и последующего сайленсинга гена-мишени. Кроме того, наиболее заметный эффект подавления трансгена *NPTII* был отмечен при низкой влажности почвы. Возможно, это связано с тем, что растения в условиях дефицита воды более интенсивно поглощают влагу с поверхности листьев, вместе с которой в растение проникают дцРНК.

Ряд исследований показали, что уровень мРНК трансгенов под контролем CaMV 35S может заметно различаться в зависимости от условий культивирования растений и постепенно увеличивается с течением времени (Boyko et al., 2009, Kiselev et al., 2021). Было показано, что наиболее оптимальными способами для индукции сайленсинга у растений *A. thaliana* с помощью экзогенных дцРНК являются распыление с использованием пульверизатора и поверхностная обработка растений мягкими кисточками. Возможно, что для других видов растений оптимальным будет другой метод доставки дцРНК на поверхность растений, но это требует дальнейшего исследования. Также показано, что экзогенное применение *NPTII*- или *EGFP*-дцРНК подавляло уровень транскрипции *NPTII* и *EGFP* у *A. thaliana*.

Известно, что трансгены более склонны к транзитивности, то есть к распространению сайленсинга за пределы исходного целевого сайта. Трансгены обычно находятся под контролем сильного промотора, обеспечивающего высокий уровень экспрессии и, таким образом, повышается вероятность продукции aberrантных мРНК, например, укороченных и/или «read-through» транскриптов (длинный транскрипт содержащий последовательности нескольких генов), что приводит к усилению сайленсинга трансгена (Vermeersch et al., 2010).

В ходе нашего исследования было также показано, что уровень цитозинового метилирования ДНК трансгенов увеличился после обработки растений трансген-специфичными дцРНК (рис. 5) и киРНК (рис. 6). Как известно РНК-направленное метилирование ДНК, это процесс, при котором киРНК вызывают ДНК метилирование целевых гомологичных последовательностей ДНК, а также последовательностей ДНК выше и ниже сайта-мишени (Cuerda-Gil and Slotkin, 2016). Возможно, что применение дцРНК, кодирующих *NPTII* или *EGFP*, может способствовать деградации мРНК трансгена, а также влиять на транскрипцию и/или образование гетерохроматина, за счет индукции и распространения метилирования ДНК в области Т-ДНК, несущей оба трансгена (Chawla et al., 2007).

В данной работе впервые показано, что внекорневое применение геноспецифичных дцРНК и киРНК значительно снижает уровни мРНК трех генов, связанных с биосинтезом антоцианов у *A. thaliana*, и значительно влияет на накопление антоцианов. Доказано влияние внешних дцРНК как на подавление экспрессии гена *AtCHS*, так и на усиление экспрессии *AtCHS*, путем блокирования регуляторных генов *AtMYBL2* и *AtANAC032*. Более того, во всех случаях неспецифические *NPTII*-дцРНК не влияли на экспрессию генов *AtCHS*, *AtMYBL2* и *AtANAC032*, что в свою очередь доказывает специфичность сайленсинга генов, вызванного экзогенными дцРНК и киРНК. В настоящее время известно, что экзогенные геноспецифичные дцРНК вызывают подавление эндогенных генов растений (Marcianò et al., 2021; Nerva et al., 2022). Однако, на данный момент нет исследований, в которых для анализа процессинга экзогенных дцРНК, нацеленных на гены растений применялось РНК-секвенирование. В данной работе впервые показано, что применение *AtCHS*- и *NPTII*-дцРНК привело к появлению большого количества малых РНК, комплементарных *AtCHS* и *NPTII*, при этом малые РНК не были обнаружены в растениях, обработанных водой. Полученные данные доказывают, что экзогенные *AtCHS*-дцРНК преобразуются в киРНК, которые нацелены на мРНК гена *AtCHS*. Это приводит к подавлению экспрессии *AtCHS*. Преобладание малых РНК длиной 21, 23 и 24 нуклеотида подтверждает полученные ранее результаты других ученых, свидетельствующие о том, что основная часть пула малых РНК в растениях представлена молекулами размером от 21 до 24 нуклеотидов (Wilson et al., 2013; Tang et al., 2022). Распределение длин малых РНК после применения экзогенных дцРНК также было похоже на

данные литературы (Power et al., 2020), которые описывают преобладание 21-нуклеотидных и 24-нуклеотидных малых РНК.

Таким образом, наши результаты демонстрируют высокий потенциал экзогенных дцРНК и киРНК для регуляции экспрессии эндогенных генов растений из-за выраженного эффекта подавления экспрессии гена-мишени. Доказано, что экзогенное применение дцРНК и киРНК способно вызывать желаемые фенотипические и биохимические изменения. Итоговые результаты показывают, что внешняя обработка поверхности растений водными растворами дцРНК или киРНК имеет значительный потенциал для использования в сельском хозяйстве, а также для фундаментальных исследований функций генов растений.

ВЫВОДЫ

1. Обработка листовой поверхности растений *A. thaliana* *in vitro* синтезированными *NPTII*- или *EGFP*-кодирующими дцРНК вызывает значительное снижение уровня мРНК и белков трансгенов в *NPTII*- или *EGFP*-трансгенных растениях *A. thaliana*.
2. Экзогенные *in vitro* синтезированные *NPTII*-кодирующие киРНК вызывают снижение уровня мРНК транскриптов и белков *NPTII* в растениях *A. thaliana*. Более значимое и стабильное подавление экспрессии *NPTII* наблюдалось при применении метилированных форм киРНК.
3. Показано, что наибольший эффект сайленсинга трансгенов *NPTII* и *EGFP* достигается при обработке четырехнедельных растений водными растворами *NPTII*-кодирующих дцРНК и киРНК в концентрации 0.35 мкг/мкл в вечернее и ночное время методами распыления с использованием пульверизатора и поверхностной обработки мягкими кисточками. Низкая влажность почвы способствует подавлению экспрессии трансгена экзогенными дцРНК.
4. Ингибирование экспрессии трансгенов *NPTII* и *EGFP* при обработке растений дцРНК и киРНК сопровождалось увеличением метилирования цитозинов ДНК трансгенов, что в свою очередь указывает на активацию РНК-направленного метилирования ДНК.
5. Обработка растений *A. thaliana* синтетическими *AtCHS*-кодирующими дцРНК приводила к сайленсингу гена *AtCHS* и снижению общего содержания антоцианов в 1.7-2 раза в условиях, индуцирующих накопление антоцианов. Обработка растений *AtMYBL2*-дцРНК или *AtANAC032*-дцРНК приводит к повышению экспрессии *AtCHS* в 3.3-6.4 раза и увеличению общего содержания антоцианов в 1.7 раза после применения *AtMYBL2*-дцРНК.
6. Установлено, что применение *AtCHS*-дцРНК приводит к появлению большого количества *AtCHS*-специфичных малых РНК. Таким образом, экзогенные *AtCHS*-дцРНК подвергаются расщеплению до киРНК и

происходит индукция процессов РНК-интерференции, ведущая к подавлению экспрессии гена *AtCHS*.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ
Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах
из списка ВАК РФ:**

1. Dubrovina A.S., Aleynova O.A., Kalachev A.V., Suprun A.R., Ogneva Z.V., Kiselev K.V. Induction of transgene suppression in plants via external application of synthetic dsRNA // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2019 — V. 20. — P. 1585.
2. Dubrovina A.S., Aleynova O.A., Suprun A.R., Ogneva Z.V., Kiselev K.V. Transgene suppression in plants by foliar application of in vitro-synthesized small interfering RNAs // *Applied Microbiology and Biotechnology*. — 2020 — V. 104. — P. 2125 — 2135.
3. Kiselev K.V., Suprun A.R., Aleynova O.A., Ogneva Z.V., Dubrovina A.S. Physiological Conditions and dsRNA Application Approaches for Exogenously induced RNA Interference in *Arabidopsis thaliana* // *Plants*. — 2020 — V. 10. — P. 264.
4. Kiselev K.V., Suprun A.R., Aleynova O.A., Ogneva Z.V., Kalachev A.V., Dubrovina A.S. External dsRNA downregulates anthocyanin biosynthesis-related genes and affects anthocyanin accumulation in *Arabidopsis thaliana* // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2021 — V. 22. — P. 6749.
5. Kiselev K.V., Suprun A.R., Aleynova O.A., Ogneva Z.V., Kostetsky E.Y., Dubrovina A.S. The Specificity of Transgene Suppression in Plants by Exogenous dsRNA // *Plants-Basel*. — 2022 — V. 11. — P. 715.
6. Nityagovsky N.N., Kiselev K.V., Suprun A.R., Dubrovina A.S. Exogenous dsRNA Induces RNA Interference of a Chalcone Synthase Gene in *Arabidopsis thaliana* // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2022 — V. 23. — P. 5325.

Работа, опубликованная в материалах международной научной конференции:

1. Dubrovina A.S., Aleynova O.A., Kalachev A.V., Suprun A.R., Ogneva Z.V., Kiselev K.V. A RNAi-based transgene suppression in plants via external application of synthetic dsRNAs and siRNAs // *Proceedings of Keystone Symposia on Molecular and Cell Biology “Small regulatory RNAs”*, April 14-18 2019, Daejeon, South Korea, P. 12-13.

СУПРУН АНДРЕЙ РОМАНОВИЧ

**РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *ARABIDOPSIS THALIANA* L. С
ПОМОЩЬЮ ЭКЗОГЕННОГО ПРИМЕНЕНИЯ *IN VITRO*
СИНТЕЗИРОВАННЫХ РНК**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук