

doi 10.18699/vjgb-25-123

Сайленсинг гена фитоендесатуразы табака Бентхама *Nicotiana benthamiana* с помощью корневой обработки экзогенной дцРНК

Т.С. Голубева^{1, 2} , В.А. Черенко¹, Е.А. Филипенко¹, И.В. Жирнов¹, А.А. Иванов^{1, 3}, А.В. Кочетов ¹

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 frolova@bionet.nsc.ru

Аннотация. РНК-интерференция – мощный инструмент для генного сайленсинга, благодаря чему используется при разработке новых подходов с большим потенциалом для защиты растений от вирусов, насекомых и других патогенов. Как правило, в таких системах геном растений подвергается модификациям с целью синтеза двуцепочечных РНК (дцРНК), необходимых для РНК-интерференции и последующего сайленсинга непосредственно в растительных клетках. Однако с учетом законодательства Российской Федерации такой подход не может использоваться на сельскохозяйственных растениях, что делает невозможным его применение при условии синтеза дцРНК самим растением. Применение экзогенно синтезированной дцРНК может стать перспективным способом защиты растений, так как позволяет избежать создания генетически модифицированных организмов и внедрить полученную разработку в сельском хозяйстве. Также экзогенные дцРНК имеют преимущество по сравнению с химикатами (фунгицидами, инсектицидами и т. д.), используемыми для защиты растений, так как дцРНК действуют посредством своей специфической нуклеотидной последовательности, что делает описанный подход крайне избирательным к патогену и безопасным для других организмов. В совокупности вышеперечисленные факторы делают методы РНК-интерференции весьма перспективными для применения в сельском хозяйстве с целью защиты растений, поэтому встает вопрос о крупномасштабном синтезе экзогенных молекул дцРНК, специфичных к определенному патогену, и выборе оптимального способа их доставки для достижения защитного эффекта. Целью настоящей работы является сайленсинг гена фитоендесатуразы табака Бентхама (*Nicotiana benthamiana*) с применением экзогенно синтезированной дцРНК. Ген фитоендесатуразы – очень удобная модель в экспериментах по регуляции генной активности, так как его сайленсинг сопровождается ярким фенотипическим проявлением в виде побеления листьев. Синтез дцРНК осуществляли *in vivo* в клетках *Escherichia coli*; в качестве способа доставки выбрана корневая обработка через полив растения – максимально простые и доступные манипуляции. Предполагается, что предложенный подход может быть масштабирован и адаптирован для защиты растений в сельском хозяйстве с помощью методов, в основе которых лежит РНК-интерференция.

Ключевые слова: РНК-интерференция; генный сайленсинг; фитоендесатураза; экзогенная дцРНК; *Nicotiana benthamiana*; корневая обработка

Для цитирования: Голубева Т.С., Черенко В.А., Филипенко Е.А., Жирнов И.В., Иванов А.А., Кочетов А.В. Сайленсинг гена фитоендесатуразы табака Бентхама *Nicotiana benthamiana* с помощью корневой обработки экзогенной дцРНК. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2025;29(8):1169-1175. doi 10.18699/vjgb-25-123

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (FWNR-2022-0017).


Silencing of the *Nicotiana benthamiana* phytoenddesaturase gene by root treatment of exogenous dsRNA

T.S. Golubeva^{1, 2} , V.A. Cherenko¹, E.A. Filipenko¹, I.V. Zhirnov¹, A.A. Ivanov^{1, 3}, A.V. Kochetov ¹

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 frolova@bionet.nsc.ru

Abstract. RNA interference (RNAi) is a powerful tool for gene silencing. It has recently been used to design promising plant protection strategies against pests such as viruses, insects, etc. This generally requires modifying the plant genome to achieve *in planta* synthesis of the double-stranded RNA (dsRNA), which guides the cellular RNA interference machinery to silence the genes of interest. However, given Russian legislation, the approach in which

dsRNA is synthesized by the plant itself remains unavailable for crop protection. The use of exogenously produced dsRNA appears to be a promising alternative, allowing researchers to avoid genetic modification of plants, making it possible to implement potential results in agriculture. Furthermore, exogenous dsRNAs are superior to chemical pesticides (fungicides, insecticides, etc.), which are widely used to control various plant diseases. The dsRNA acts through sequence-specific nucleic acid interactions, making it extremely selective and unlikely to harm off-target organisms. Thus, it seems promising to utilize RNAi technology for agricultural plant protection. In this case, questions arise regarding how to produce the required amounts of pathogen-specific exogenous dsRNA, and which delivery method will be optimal for providing sufficient protection. This work aims to utilize exogenous dsRNA to silence the *Nicotiana benthamiana* phytoene desaturase gene. Phytoene desaturase is a convenient model gene in gene silencing experiments, as its knockdown results in a distinct phenotypic manifestation, namely, leaf bleaching. The dsRNA synthesis for this work was performed *in vivo* in *Escherichia coli* cells, and the chosen delivery method was root treatment through watering, both techniques being as simple and accessible as possible. It is surmised that the proposed approach could be adapted for broader use of RNAi technologies in agricultural crop protection.

Key words: RNA interference; gene silencing; phytoene desaturase; exogenous dsRNA; *Nicotiana benthamiana*; root treatment

For citation: Golubeva T.S., Cherenko V.A., Filipenko E.A., Zhirnov I.V., Ivanov A.A., Kochetov A.V. Silencing of the *Nicotiana benthamiana* phytoendesaturase gene by root treatment of exogenous dsRNA. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(8):1169-1175. doi 10.18699/vjgb-25-123

Введение

Для защиты растений от патогенов и вредителей в сельском хозяйстве в больших количествах используются разнообразные химические пестициды. Такое интенсивное применение химикатов создает потенциальные риски для здоровья человека, полезных микроорганизмов и в целом для окружающей среды (Niehl et al., 2018). В связи с этим существует потребность в новых альтернативных методах борьбы с заболеваниями растений. Многообещающий новый подход с большим потенциалом для защиты растений от различных патогенов включает использование двуцепочечной РНК (дцРНК).

Применение дцРНК может иметь многочисленные преимущества по сравнению с использованием химических соединений. В отличие от химических соединений, которые редко обладают избирательным воздействием на конкретный организм или процесс, дцРНК действуют посредством своей специфической нуклеотидной последовательности. Таким образом, будучи сконструированными для воздействия на конкретную генную мишень патогена с гомологичной последовательностью, дцРНК и ее производные, малые интерферирующие РНК (миРНК), будут действовать только против предполагаемого патогена. Важно отметить, что, в отличие от химических пестицидов, агенты дцРНК являются биосовместимыми и биоразлагаемыми соединениями. Таким образом, использование дцРНК – значительно более гибкий и экологичный подход.

Однако широкое применение обработки дцРНК в сельском хозяйстве затруднено отсутствием эффективных и экономичных методов синтеза больших количеств этих дцРНК: основным подходом для получения дцРНК до сих пор был физический отжиг двух ферментативно синтезированных одноцепочечных РНК (оцРНК) *in vitro* (Laurila et al., 2002). Также на эффективность экзогенно-применяемой дцРНК в растениях может влиять несколько факторов: концентрация/доза и длина/размер дцРНК, способ применения, метод доставки, специфическая для органов растений активность и стабильность в неблагоприятных условиях окружающей среды. Эти факторы в конечном счете определяют скорость поглощения экзогенных дцРНК растительными клетками для запуска РНК-

интерференции. С учетом всех перечисленных факторов существует необходимость разработки эффективного метода для крупномасштабного синтеза молекул дцРНК и выбора оптимального способа их доставки (Carthew, Sontheimer, 2009).

В настоящей статье мы предлагаем способ регуляции активности гена фитоендезауразы табака *Nicotiana benthamiana* с помощью дцРНК, синтезированной в клетках *Escherichia coli*: корневая обработка растений грубым лизатом бактерий, содержащим целевую дцРНК, приводит к фотообесцвечиванию листьев растений через механизм РНК-интерференции.

Ген фитоендезауразы кодирует ключевой фермент синтеза каротиноидов и часто используется в качестве модели при разработке новых подходов для регуляции активности генов, так как его сайленсинг имеет фенотипическое проявление в виде фотообесцвечивания листьев. Корневая обработка (полив) грубым лизатом позволяет масштабировать процесс обработки растений дцРНК и снизить время и ресурсы на доставку до минимума. Предполагается, что разработанный подход на модели гена фитоендезауразы может быть применен для защиты сельскохозяйственных растений через регуляцию активности генов посредством РНК-интерференции.

Материалы и методы

Характеристика бактериального штамма. Использован штамм *E. coli* HT115 (DE3) [F⁻, mcrA, mcrB, IN(rmD-rmE)1, rnc14::Tn10(DE3 lysogen: lacUV5 promoter – T7 polymerase) (IPTG-inducible T7 polymerase) (RNase III minus)], являющийся дефицитным по РНКазе III, что делает его использование возможным для наработки дцРНК. Культивирование штамма проводили на стандартной жидкой LB среде или LB агаре с тетрациклином (12.5 мкг/мл).

Характеристика плазмиды L4440. Синтез дцРНК осуществлялся с помощью плазмиды L4440 (Plasmid #1654, Addgene, США). Особенность этой плазмиды – наличие двух сильных T7-промоторов в противоположных направлениях, благодаря чему она используется для наработки дцРНК фрагментов. Плазида содержит ген устойчивости к ампициллину.

Подбор праймеров проводили с помощью ресурса Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) по матрице мРНК гена фитоендесатуразы *N. benthamiana*. Выбранные варианты праймеров были проверены на наличие шпилек, само- и гетеродимеров с применением инструмента OligoAnalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). В результате были синтезированы праймеры: прямой 5'-GGCACTCAACTTTATAAACC-3' и обратный 5'-CTTCAGTTTCTGTCAAACCATATATG GAC-3' («Синтол», Россия).

Получение кДНК. Выделение мРНК осуществляли с применением набора RNeasy Plant (Qiagen, США) согласно протоколу производителя. Полученный образец РНК анализировали на РНК-анализаторе Bioanalyzer Instrument 2100 (ЦКП «Геномика» СО РАН). Обратную транскрипцию выполняли с помощью набора BiolabMix R01-250 (Биолабмикс, Россия), для наработки фрагментов использовали набор HS-qPCR SYBR Blue (Биолабмикс), амплификацию проводили в приборе Bio-Rad IQ (Bio-Rad, США).

Клонирование фрагмента гена *pds* выполняли в два этапа. Сначала продукт амплификации, фрагмент гена *pds*, был клонирован в промежуточный Т-вектор pCR2.1 (Invitrogen, США). Колонии бактерий, содержащие фрагмент гена, сначала отбирали методом бело-голубой селекции. Окончательный отбор клонов осуществляли по наличию полного фрагмента гена в спектрах рестрикции после обработки эндонуклеазой *EcoRI*.

Клонирование в конечный вектор L4440 выполняли лигазно-рестриктазным методом с использованием эндонуклеаз рестрикции *PstI* и *NcoI*. Для этого соответствующие сайты рестрикции были введены в состав фрагмента гена *pds* при его амплификации (эти же сайты имеются в структуре вектора L4440). Отбор рекомбинантных клонов *E. coli* проводили на селективной среде, содержащей ампициллин. Для проверки наличия фрагмента гена *pds* в составе вектора L4440 выполняли ПЦР с использованием специфичных для гена *pds* праймеров. Окончательное наличие фрагмента гена *pds* и его нуклеотидную последовательность подтверждали секвенированием по Сэнгеру.

Трансформация штамма *E. coli* HT115 (DE3) плазмидой L4440. Компетентные клетки были приготовлены согласно протоколу (Nishimura et al., 1990). Для трансформации аликвоту бактериальной суспензии объемом 0.1 мл смешивали с 5 мкл буфера TE, содержащего 100 пг плазмиды L4440, и инкубировали на льду 30 мин. Далее суспензию клеток выдерживали в термостате при 42 °С в течение 60 с, затем снова помещали в лед на 2 мин и разбавляли в 10 раз предварительно разогретой до 37 °С средой LB. Суспензию инкубировали при 37 °С в течение 1 ч для формирования устойчивости к ампициллину. Затем 100 мкл суспензии втирали в LB агар с ампициллином (50 мкг/мл), чашки инкубировали при 37 °С в течение 24 ч.

Наличие встроенного фрагмента гена *pds* проверяли при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) выбранных колоний, а также секвенированием по Сэнгеру (ЦКП «Геномика» СО РАН).

Положительный контроль с помощью вирус-индуцированного генного сайленсинга (VIGS). VIGS был

использован в качестве положительного контроля. Семена *N. benthamiana* сначала проращивали, затем проростки сажали в пластиковые горшки (диаметр 10 см), содержащие смесь универсального почвогрунта (TerraVita, Россия), перлита и вермикулита (соотношение по объему 8:1:1), и культивировали в ростовой камере при непрерывном освещении и температуре 24 °С.

Векторы для VIGS pTRV1 (pYL192) и pTRV2 (pYL279), полученные из Центра биологических ресурсов арабидопсиса (ABRC, США), описаны ранее (Liu et al., 2002; Burch-Smith et al., 2006). Тотальную РНК выделяли из тканей листьев *Nicotiana tabacum* cv. SR1 (последовательность гена фитоендесатуразы у этого вида совпадает с таковой для *N. benthamiana*) с помощью реагента Trizol (Invitrogen) и синтезировали кДНК с помощью набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с инструкциями производителя. Полученную кДНК использовали для амплификации фрагмента гена *NtPDS* (номер доступа в GenBank AJ616742.1) методом ПЦР с применением высокоэффективной полимеразы Phusion (New England Biolabs, США) в соответствии с инструкцией производителя. Выбранные варианты праймеров были проверены на наличие шпилек, само- и гетеродимеров с помощью инструмента OligoAnalyzer. В результате были синтезированы праймеры: прямой 5'-CACCGGCACTCAACTTTATAAACC-3' и обратный 5'-CTTCAGTTTCTGTCAAACCATATATG GAC-3' («Синтол», Россия).

Полученный в результате ПЦР фрагмент длиной 413 п. н. был клонирован в вектор pENTR/D-TOPO (Invitrogen) и проверен секвенированием, а затем рекомбинирован в вектор pTRV2 путем проведения реакции LR-рекомбинации с помощью системы Gateway (Invitrogen). Полученный вектор pTRV2::NtPDS трансформировали тепловым шоком в штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 и использовали в экспериментах VIGS.

Штамм *A. tumefaciens* GV2260, несущий векторы pTRV1, pTRV2 и pTRV2::NtPDS, был отдельно инокулирован в жидкую среду LB, содержащую канамицин (100 мкг/мл) и рифампицин (25 мкг/мл). Культуры инкубировали в течение ночи при встряхивании при 28 °С. Клетки отбирали из ночных культур, повторно суспендировали в индукционном буфере (10 mM MES; 10 mM MgCl₂; 250 мкМ ацетосирингона, доведенного до pH 5.5 с помощью 1 M KOH), и инкубировали в течение 6 ч при комнатной температуре в шейкере. После инкубации клетки собирали из индуцированных культур и повторно суспендировали в буфере для инфильтрации (10 mM MES, отрегулированный до pH 5.5 с помощью 1 M KOH) с разведением до OD₆₀₀ = 1.0.

Для инфильтрации листьев табака суспензию *A. tumefaciens* GV2260, содержащую pTRV1 и pTRV2 или pTRV2::NtPDS, смешивали в соотношении 1:1 по объему и инфильтрировывали в нижние листья 21-дневных растений *N. benthamiana* с помощью 1 мл шприца без иглы (Ratcliff et al., 2001; Liu et al., 2002). Инфильтрированные растения выдерживали при постоянном освещении в течение 12 ч при температуре 20 °С для эффективной инсерции Т-ДНК *Agrobacterium* (Brigneti et al., 2004).

Корневая обработка *N. benthamiana* грубым лизатом *E. coli* HT115 (DE3), содержащим dsRNA фитоеендесатуразы. В качестве источника экзогенной дцРНК могут быть использованы грубые лизаты бактериальных суспензий после индукции синтеза дцРНК. Корневые обработки также применяются для доставки целевых молекул для посттрансляционного геномного сайленсинга у растений (Jiang et al., 2014; Li et al., 2015; Dubrovina, Kiselev, 2019).

Для корневой обработки были приготовлены грубые лизаты штамма *E. coli* HT115, трансформированного плазмидой L4440 со встроенным фрагментом гена фитоеендесатуразы. В качестве контроля были взяты лизаты бактерий без плазмиды, со встроенной нативной плазмиды L4440, буфер и вода.

Приготовление грубого лизата осуществляли согласно протоколу (Gan et al., 2010). Ночную культуру бактерий выращивали в течение 16 ч со встряхиванием при 37 °C на стандартном LB бульоне (с добавлением ампициллина в концентрации 50 мкг/мл для штаммов, содержащих плазмиду L4440). Затем бактериальную суспензию разводили до OD₅₉₅ = 0.5. Далее синтез дцРНК индуцировали добавлением IPTG в конечной концентрации 0.6 mM, и бактерии инкубировали при 37 °C в течение 4 ч. Спустя отведенное время суспензию центрифугировали для получения осадка (1500 g, 15 мин, 4 °C), который затем ресуспендировали в ледяном буфере (50 mM Tris·HCl, 10 mM EDTA, pH 7.5) объемом 1/50 от исходного. Далее пробирки помещали в лед и обрабатывали ультразвуком (20 кГц, 15 мин). Полученный лизат центрифугировали (9000 об/мин, 20 мин, 4 °C); супернатант был использован для обработки растений (по 2 мл на одно растение).

Для каждого типа корневой обработки (вода, буфер tris-EDTA, *E. coli* HT115 без плазмиды, *E. coli* HT115 с плазмидой L4440, *E. coli* HT115 с плазмидой L4440 со встроенным фрагментом гена фитоеендесатуразы) использовано по 4 растения. Растения выращивали в стерильной смеси универсального почвогрунта (TerraVita), перлита и вермикулита (соотношение по объему 8:1:1). Обработку растений проводили 3 раза в неделю (понедельник, среда, пятница), длительность эксперимента – 4 недели. Корневую обработку проводили через полив растений супернатантом, ресуспендированным в 2 мл буфера tris-EDTA.

Экстракция дцРНК. 1 мл бактериальной суспензии центрифугировали 5 мин при 10000 об/мин и удаляли супернатант. Осадок растворяли в 200 мкл смеси 1 M CH₃COONH₄ и 10 mM изоамиловом спирте и экстрагировали эквивалентным объемом смеси изопропанола, фенола и изоамилового спирта в соотношении 25:24:1). Инкубировали 15 мин при 65 °C и центрифугировали 15 мин 10000 об/мин. Отбирали супернатант и добавляли эквивалентный объем изопропанола. Инкубировали 12 ч при –20 °C. После инкубации центрифугировали 30 мин при 12000 об/мин. Осторожно убрали жидкость. Осадок промывали 2 раза 70 % этанолом и ресуспендировали в 10 мкл воды без РНКаз; добавляли ДНКазный буфер. Инкубировали 30 мин, затем добавляли 20 мкл РНКазы А и 20 мкл ДНКазы. Инкубировали 1 ч при 37 °C. Экстрагировали 100 мкл смеси изопропанола, фенола и изоамилового

спирта в соотношении 25:24:1. Интенсивно перемешивали и центрифугировали 12000 об/мин 15 мин. Супернатант удаляли, осадок промывали 200 мкл 70 % этанола, высушивали при комнатной температуре и растворяли в 1-кратном буфере TE. Наличие и целостность дцРНК проверили с помощью электрофоретического анализа в 1 % агарозном геле.

Результаты

Получение экзогенной дцРНК с использованием штамма *E. coli* HT115, трансформированного плазмидой L4440

Экзогенный синтез дцРНК в работе выполнен *in vivo* с помощью штамма *E. coli* HT115 (DE3). Штамм является дефицитным по РНКазе III, что позволяет ему накапливать фрагменты дцРНК. Для его трансформации взят вектор L4440, специально разработанный для синтеза дцРНК: наличие двух сильных T7-промоторов в противоположных направлениях приводит к синтезу самокомплементарных последовательностей РНК.

Фрагмент гена фитоеендесатуразы табака длиной 404 п. н. был клонирован в вектор L4440 по липким концам с использованием эндонуклеаз рестрикции *Pst*I и *Nco*I, наличие требуемого фрагмента в векторе подтверждено секвенированием. Карта полученной плазмиды представлена на рис. 1.

Наличие целевых фрагментов нужной длины подтверждено электрофоретическим анализом (рис. 2).

Получение грубого лизата бактерий, содержащего фрагменты дцРНК для сайленсинга фитоеендесатуразы *N. benthamiana*

Для наработки целевых фрагментов дцРНК для сайленсинга генов фитоеендесатуразы использован штамм *E. coli* HT115 (DE3), трансформированной вектором PDS_benthamiana_L4440. Индукцию синтеза дцРНК осуществляли с помощью IPTG. Далее из бактериальной суспензии был получен грубый лизат (Gan et al., 2010), содержащий дцРНК. Для обработки растений *N. benthamiana* были заготовлены аликвоты грубого лизата по 2 мл.

Корневая обработка *N. benthamiana* грубым бактериальным лизатом, содержащим дцРНК для сайленсинга гена фитоеендесатуразы *pds*

В данном исследовании впервые выполнена корневая обработка табака грубым лизатом бактерий, содержащим экзогенную дцРНК. В качестве модельного растения для проведения эксперимента использован табак Бентхама (*N. benthamiana*). Опытные растения поливали грубым лизатом *E. coli* HT115 (DE3) с плазмидой PDS_benthamiana_L4440. По истечению 4 недель корневой обработки листья *N. benthamiana*, политые лизатом бактерий со вставкой фрагмента гена фитоеендесатуразы, демонстрировали фенотипы фотообесцвечивания молодых листьев, характерные для сайленсинга гена фитоеендесатуразы (рис. 3). Листья растений *N. benthamiana* из отрицательного контроля не изменяли фенотип на протяжении всего времени обработки.

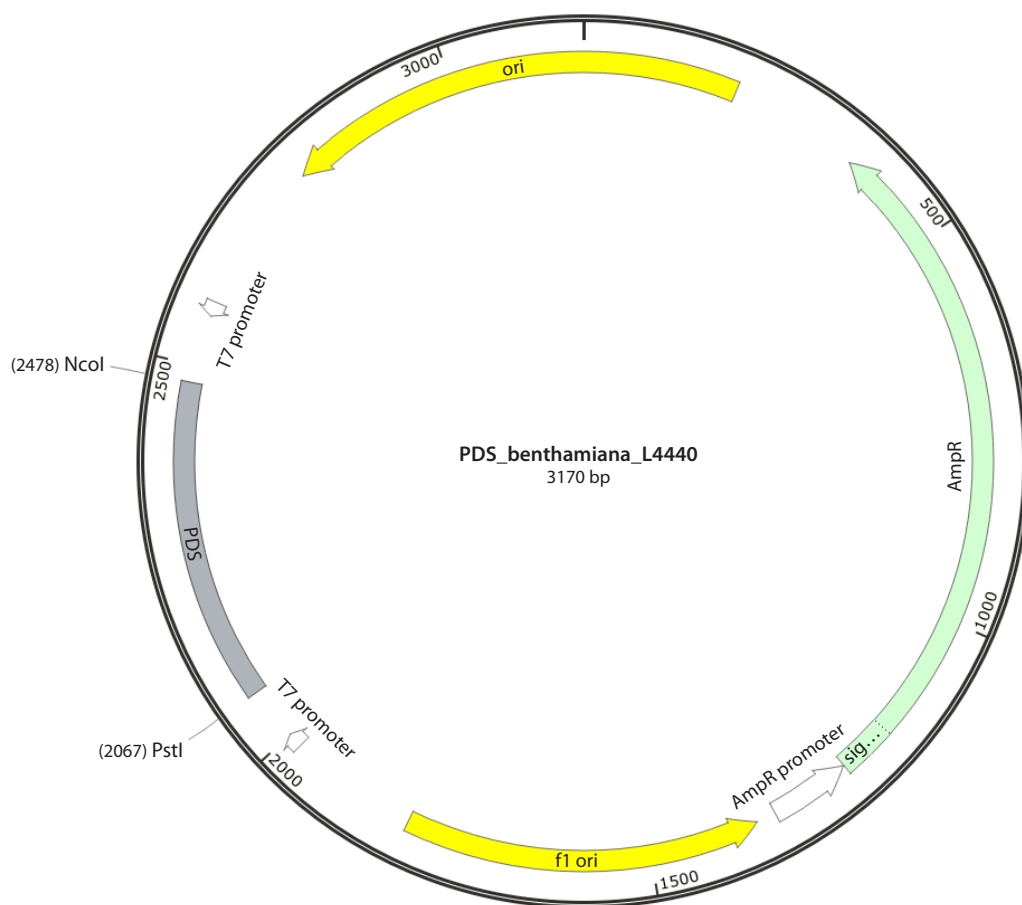


Рис. 1. Карта вектора L4440, содержащего фрагмент гена фитоендесатуразы (*pds*) *N. benthamiana* (PDS_benthamiana_L4440).

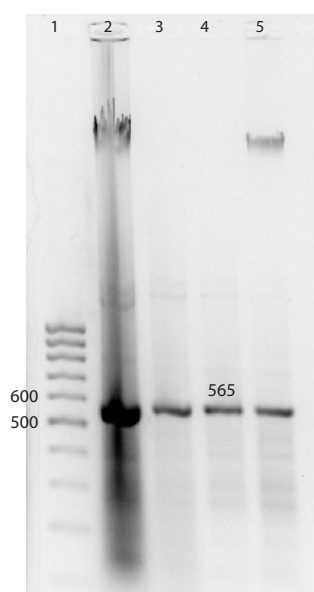


Рис. 2. Электрофоретический анализ фрагментов дцРНК, синтезированных в *E. coli* HT115 (DE3), трансформированной вектором PDS_benthamiana_L4440.

1 – ДНК-маркер 100 п.н.; 2 – суммарная фракция нуклеиновых кислот; 3 – суммарная фракция нуклеиновых кислот, обработанная ДНКазой; 4 – суммарная фракция нуклеиновых кислот, обработанная РНКазой А и ДНКазой; 5 – суммарная фракция нуклеиновых кислот, обработанная РНКазой А.

Обсуждение

В настоящее время многочисленные исследования показывают возможность выключения или снижения экспрессии определенных генов для регуляции устойчивости, ростовых процессов и других свойств растений с помощью индукции РНК-интерференции (Kamthan et al., 2015; Tiwari et al., 2017). Однако применение этого подхода, как правило, включает этап получения трансгенного растения либо применение конструкций на основе ослабленных вирусов растений.

Проблема доставки РНК без использования векторных систем и модификации генома встала особенно остро после запрета использования ГМО в России и странах Европы. В последнее время в научной литературе стали появляться данные о том, что экзогенно примененные дцРНК (например, путем опрыскивания, опрыскивания под высоким давлением, использования материалов для адгезии РНК или с помощью белков-переносчиков) способны проникать в сосудистую систему растения и непосредственно в клетки растения; после чего они индуцируют процесс РНК-интерференции, тем самым повышая устойчивость растений к грибной и вирусной инфекции (Numata et al., 2014; Koch et al., 2016; Mitter et al., 2017; Wang et al., 2018). Имеются единичные работы по доставке дцРНК с целью регуляции работы генов с помощью полива. Например, таким способом доставки удалось повы-

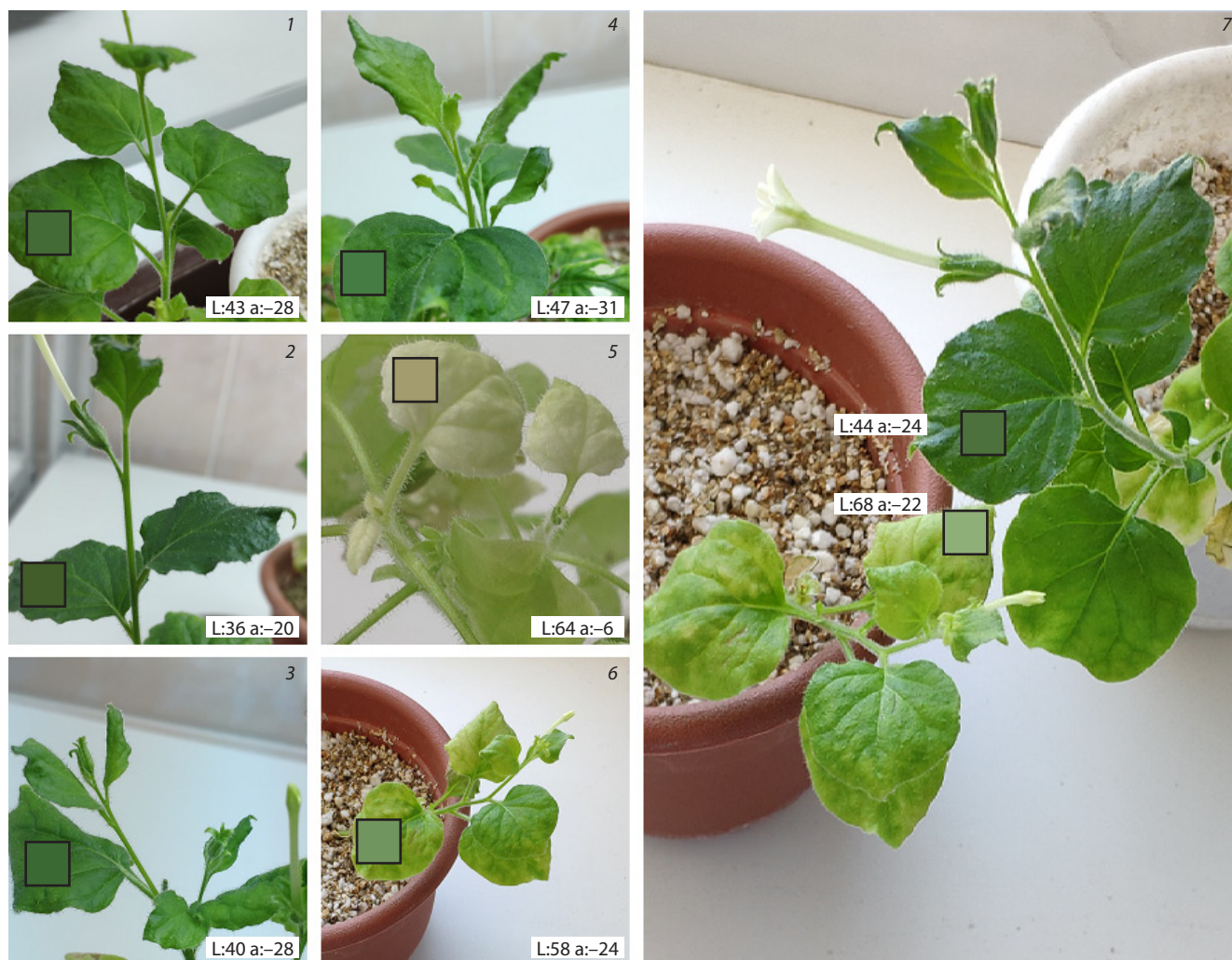


Рис. 3. Побеление листьев *N. benthamiana* после индуцированного сайленсинга фитоендесатуразы с помощью экзогенной дцРНК.

1 – вода; 2 – Tris-EDTA; 3 – грубый лизат *E. coli* HT115 без плазмиды; 4 – грубый лизат *E. coli* HT115 с нативной плазмидой L4440; 5 – VIGS; 6 – грубый лизат *E. coli* HT115 с плазмидой L4440, содержащей фрагмент гена фитоендесатуразы; 7 – сравнение отрицательного контроля с экспериментальным растением при сайленсинге фитоендесатуразы. Контроли в эксперименте: обработки 1–4 служат отрицательными контролями; 5 – положительный контроль. Характеристики фотообесцвечивания листьев: L – светлота цвета в относительных единицах (чем выше значение, тем светлее оттенок, от 0 до 100); а – зелено-красный канал в относительных единицах (чем меньше значение, тем зеленее оттенок, от –127 до 0).

сить устойчивость кукурузы к вирусу мозаики сахарного тростника (SCMV) (Gan et al., 2010).

По аналогии нами получен грубый лизат, содержащий дцРНК фрагмента гена фитоендесатуразы *N. benthamiana*, и проведена корневая обработка табака в течение 4 недель, в результате чего все экспериментальные растения проявили фенотип фотообесцвечивания молодых листьев, характерный для сайленсинга фитоендесатуразы. Степень выраженности побеления сопоставима с положительным контролем VIGS. Таким образом, предлагаемый нами подход позволяет регулировать активность генов растений, не прибегая к созданию ГМО и используя только экологичные методы, что может быть очень перспективным для внедрения в сельское хозяйство с целью повышения стрессоустойчивости культурных растений.

В основе нашей работы лежит исследование F. Tenllado с коллегами (2003), которым удалось защитить табак Бенгхама *N. benthamiana* от вируса мягкой крапчатости перца (PMMoV) с помощью распыления на надземную часть

растений грубого лизата бактерий *E. coli* HT115, содержащего дцРНК. Эти ученые отмечают, что такой способ получения целевых молекул дцРНК достаточно прост и выгоден экономически по сравнению с синтезом дцРНК *in vitro*. Также они показали, что применение грубого лизата может быть более выгодно с экономической точки зрения, нежели использование очищенного препарата, при этом существенных потерь в эффективности не наблюдалось.

Так как защита растений с применением методов РНК-интерференции может быть альтернативой созданию ГМО, запрещенных законодательно в Российской Федерации для выращивания в сельскохозяйственных целях, мы решили развить идею F. Tenllado с коллегами (2003) и предложить еще более простой способ доставки дцРНК через корневую обработку – полив растения грубым лизатом. Нами показано, что внесение экзогенно синтезированной дцРНК таким способом достаточно эффективно может влиять на фенотип растений, что подтверждает

попадание внесенной дцРНК в растения через корни и ее транспорт в надземную часть растения, где через механизм РНК-интерференции происходит регуляция активности целевого гена – фитоендесатуразы.

Заключение

В последнее время активно развиваются методы на основе РНК-интерференции для защиты растений, особенно с применением экзогенно синтезированных дцРНК, так как они позволяют избежать создания ГМО, законодательно запрещенных для применения в сельском хозяйстве ряда стран, в том числе России. Однако применение экзогенных молекул дцРНК обладает рядом сложностей. Например, способ получения дцРНК должен легко масштабироваться и быть экономически выгодным, а доставка полученных молекул – максимально простой и при этом эффективной. В своей работе для синтеза дцРНК мы разработали систему из штамма *E. coli* HT115, трансформированного плазмидой L4440 с фрагментом гена фитоендесатуразы табака Бентхама (*N. benthamiana*), а для доставки полученных молекул использовали корневую обработку – полив растений грубым лизатом. В результате нам удалось добиться сайленсинга гена фитоендесатуразы, что подтверждает возможность регуляции работы генов растений без создания ГМО. Предлагаемый нами подход также может быть масштабирован и перспективен для применения в сельском хозяйстве с целью защиты растений от патогенов.

Список литературы / References

- Brigneti G., Martín-Hernández A.M., Jin H., Chen J., Baulcombe D.C., Baker B., Jones J.D.G. Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *Plant J.* 2004;39(2):264-272. doi 10.1111/J.1365-313X.2004.02122.x
- Burch-Smith T.M., Schiff M., Liu Y., Dinesh-Kumar S.P. Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2006; 142(1):21-27. doi 10.1104/pp.106.084624
- Carthew R.W., Sontheimer E.J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell.* 2009;136(4):642-655. doi 10.1016/j.cell.2009.01.035
- Dubrovina A.S., Kiselev K.V. Exogenous RNAs for gene regulation and plant resistance. *Int J Mol Sci.* 2019;20(9):2282. doi 10.3390/ijms20092282
- Gan D., Zhang J., Jiang H., Jiang T., Zhu S., Cheng B. Bacterially expressed dsRNA protects maize against SCMV infection. *Plant Cell Rep.* 2010;29(11):1261-1268. doi 10.1007/s00299-010-0911-z
- Jiang L., Ding L., He B., Shen J., Xu Z., Yin M., Zhang X. Systemic gene silencing in plants triggered by fluorescent nanoparticle-delivered double-stranded RNA. *Nanoscale.* 2014;6(17):9965-9969. doi 10.1039/c4nr03481c
- Kamthan A., Chaudhuri A., Kamthan M., Datta A. Small RNAs in plants: recent development and application for crop improvement. *Front Plant Sci.* 2015;6(APR). doi 10.3389/FPLS.2015.00208/PDF
- Koch A., Biedenkopf D., Furch A., Weber L., Rossbach O., Abdelatef E., Linicus L., Johannsmeier J., Jelonek L., Goesmann A., Cardoza V., McMillan J., Mentzel T., Kogel K.H. An RNAi-based control of *Fusarium graminearum* infections through spraying of long dsRNAs involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery. *PLoS Pathog.* 2016;12(10):e1005901. doi 10.1371/journal.ppat.1005901
- Laurila M.R.L., Makeyev E.V., Bamford D.H. Bacteriophage ϕ 6 RNA-dependent RNA polymerase. Molecular details of initiating nucleic acid synthesis without primer. *J Biol Chem.* 2002;277(19):17117-17124. doi 10.1074/jbc.M111220200
- Li H., Guan R., Guo H., Miao X. New insights into an RNAi approach for plant defence against piercing-sucking and stem-borer insect pests. *Plant Cell Environ.* 2015;38(11):2277-2285. doi 10.1111/pce.12546
- Liu Y., Schiff M., Marathe R., Dinesh-Kumar S.P. Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPRI/NIM1* like genes are required for *N*-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J.* 2002;30(4):415-429. doi 10.1046/J.1365-313X.2002.01297.x
- Mitter N., Worrall E.A., Robinson K.E., Li P., Jain R.G., Taochy C., Fletcher S.J., Carroll B.J., Lu G.Q., Xu Z.P. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nat Plants.* 2017;3:16207. doi 10.1038/nplants.2016.207
- Niehl A., Soininen M., Poranen M.M., Heinlein M. Synthetic biology approach for plant protection using dsRNA. *Plant Biotechnol J.* 2018;16(9):1679-1687. doi 10.1111/pbi.12904
- Nishimura A., Morita M., Nishimura Y., Sugino Y. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(20):6169. doi 10.1093/nar/18.20.6169
- Numata K., Ohtani M., Yoshizumi T., Demura T., Kodama Y. Local gene silencing in plants via synthetic dsRNA and carrier peptide. *Plant Biotechnol J.* 2014;12(8):1027-1034. doi 10.1111/pbi.12208
- Ratcliff F., Martín-Hernández A.M., Baulcombe D.C. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J.* 2001;25(2):237-245. doi 10.1046/J.0960-7412.2000.00942.x
- Tenllado F., Martínez-García B., Vargas M., Díaz-Ruiz J.R. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. *BMC Biotechnol.* 2003;3:3. doi 10.1186/1472-6750-3-3
- Tiwari I.M., Jesuraj A., Kamboj R., Devanna B.N., Botella J.R., Sharma T.R. Host Delivered RNAi, an efficient approach to increase rice resistance to sheath blight pathogen (*Rhizoctonia solani*). *Sci Rep.* 2017;7(1):1-14. doi 10.1038/S41598-017-07749
- Wang J., Gu L., Knipple D.C. Evaluation of some potential target genes and methods for RNAi-mediated pest control of the corn earworm *Helicoverpa zea*. *Pestic Biochem Physiol.* 2018;149:67-72. doi 10.1016/j.pestbp.2018.05.012

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 15.06.2025. После доработки 19.09.2025. Принята к публикации 23.09.2025.