Облікова картка дисертації

I. Загальні відомості

Державний обліковий номер: 0513U001228

Особливі позначки: відкрита

Дата реєстрації: 13-12-2013

Статус: Захищена

Реквізити наказу МОН / наказу закладу:

II. Відомості про здобувача

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Циганкова Вікторія Анатоліївна
2. Tsygankova Victotia Anatoliivna

Кваліфікація:

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Вид дисертації: доктор наук

Аспірантура/Докторантура: ні

Шифр наукової спеціальності: 03.00.20

Назва наукової спеціальності: Біотехнологія

Галузь / галузі знань: Не застосовується

Освітньо-наукова програма зі спеціальності: Не застосовується

Дата захисту: 10-12-2013

Спеціальність за освітою: 7.12020101

Місце роботи здобувача: Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України

Код за ЄДРПОУ: 03563790

Місцезнаходження: 02094, м. Київ, вул. Мурманська, 1

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

III. Відомості про організацію, де відбувся захист

Шифр спеціалізованої вченої ради (разової спеціалізованої вченої ради): Д 26.254.01

Повне найменування юридичної особи: Державна установа "Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України"

Код за ЄДРПОУ: 02128514

Місцезнаходження: Осиповського, 2А, м. Київ, Київська обл., 04123, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

IV. Відомості про підприємство, установу, організацію, в якій було виконано дисертацію

Повне найменування юридичної особи: Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України

Код за ЄДРПОУ: 03563790

Місцезнаходження: 02094, м. Київ, вул. Мурманська, 1

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

V. Відомості про дисертацію

Мова дисертації:

Коди тематичних рубрик: 62.99.29

Тема дисертації:

1. Підвищення стійкості рослин до фітопатогенних організмів шляхом індукції процесів РНК-інтерференції за допомогою полікомпонентних регуляторів росту та методів генетичної інженерії

2. Increase of plant resistance to phytopathogenic organisms through inducing of RNA-interference process with use of polycomponent growth regulators and genetic-ingeneering methods

Реферат/анотація:

1. Об'єкт дослідження. Підвищення стійкості рослин до фітопатогенних організмів шляхом індукції процесів РНК-інтерференції новими полікомпонентними регуляторами росту природного походження, а також за допомогою генетично-інженерних методів. Предмет дослідження. Особливості стимулюючої дії регуляторів росту на генетичні маркери підвищення стійкості рослин до фітопатогенних організмів: зміни популяційних характеристик цитоплазматичних мРНК і малих регуляторних si/miРНК, підвищення функціональної (трансляційної) активності мРНК та сайленсингової (інгібуючої) активності si/miРНК у безклітинних системах білкового синтезу з проростків пшениці, а також зміни спектру білків, синтезованих в умовах in vivo та in vitro. Методи дослідження. У дослідженнях використовували методи культивування трансгенних коренів цикорію в умовах in vitro, біохімічні методи аналізу загального білку та поліфруктанів, ентомологічні

методи визначення чисельності шкідників рослин та антинематодної активності полікомпонентних регуляторів природного та мікробіологічного походження в умовах in vitro та in vivo, морфо-фізіологічні методи для вивчення впливу регуляторів на проростання насіння та розвиток рослин, молекулярно-біологічні методи: виділення сумарних ДНК та РНК, метод хроматографії на оліго(dT)-целюлозних колонках, метод радіоавтографії, метод визначення радіоактивності проб у сцинтиляційному лічильнику, метод фракціонування мРНП- та рРНП-часток у градієнті щільності CsCl, метод виділення цитоплазматичних малих регуляторних si/miPHK, одномірний та двомірний ПААГ-електрофорез, методи дослідження функціональної (трансляційної) активності мРНК та сайленсингової активності si/miPHK у безклітинних системах білкового синтезу з проростків пшениці, ПЛР-ампліфікація, ЗТ-ПЛР-ампліфікація, клонування ампліфікованих фрагментів ДНК у плазмідний вектор, метод флоральної генетичної трансформації, методи Дот-блот та Нозерн-блот гібридизації. Представлено результати досліджень щодо можливості підвищення стійкості рослин до фітопатогенних організмів шляхом індукції процесів РНК-інтерференції з використанням полікомпонентних регуляторів росту природного походження і методів генетичної інженерії, а також з'ясовано генетичні та епігенетичні механізми покращення цих ознак у рослин. За допомогою молекулярно-біологічних методів встановлено, що прискорююча проростання насіння квасолі дія регуляторів росту Івіну та Радостиму опосередковується шляхом активації ними біосинтезу мРНК, рРНК і білків. Методом Дот-блоттингу встановлено суттєву різницю у ступеню гомології (до 22 %) між популяціями мРНК з клітин зародкової осі насіння квасолі, необробленого та обробленого регуляторами Емістимом та Аверкомом. Встановлено вплив регуляторів росту Емістиму С, Радостиму, Агростимуліну, Зеастимуліну, Біолану на підвищення біосинтезу білків у клітинах 5-ти денних проростків рослин квасолі, гороху, сої, ячменю, пшениці, кукурудзи, а також у безклітинній системі з проростків пшениці на матрицях полі(А)+РНК з клітин цих проростків. Виявлено вплив регулятору Емістиму С на підвищення фотосинтетичної активності клітин листків рослин сої, гороху, пшениці та кукурудзи у різні періоди доби та на посилення різниць у ступеню гомології (до 13 %) між популяціями мРНК контрольних та дослідних рослин. Встановлено стимулюючу дію регуляторів росту Івіну, Емістиму, Біолану та Чаркору на підвищення приросту біомаси (від 10,0 - до 54 разів) та загального вмісту поліфруктанів (від 7,0 - до 35 разів на одиницю загальної маси коренів) у культурах "бородатих коренів" цикорію. У польових та тепличних дослідженнях встановлено підвищення стійкості ряду сільськогосподарських культур до шкідників та патогенних організмів при обробці насіння та обприскування посівів рослин регуляторами росту: Регоплантом (до 98 %), Стімпо (до 89 %) та Радостимом (до 74 %), які сприяли збереженню врожаю більш ніж на 80 % відносно контролю. За допомогою Дот-блоттингу мРНК з si/miPHK та вивченням сайленсингової активності si/miPHK в безклітинній системі білкового синтезу вперше показано, що стійкість рослин цукрового буряка до нематод H. schachtii та M. incognita досягається шляхом стимуляції регуляторами синтезу у клітинах рослин антинематодних si/miPHK. Встановлено значні різниці (до 6-23 %) у ступеню гомології між мРНК контрольних та si/miPHK дослідних рослин пшениці, огірків, картоплі, інфікованих патогенним мікроміцетом F. oxysporum і паразитичними нематодами M. incognita та D. destructor і оброблених регулятором росту Аверкомом та його похідними; у безклітинній системі з проростків пшениці виявлено вплив цих регуляторів на підвищення сайленсингової активності si/miPHK. Шляхом опосередкованої A. tumefaciens генетичної трансформації сконструйованим вектором експресії dsPHK, специфічних до консервативної ділянки гена 8H07 коренепаразитуючої нематоди H. schachtii, отримано рослини ріпаку з підвищеною стійкістю до цієї нематоди. Нозерн-блот аналізом підтверджено наявність у геномі рослин ріпаку кДНК-фрагменту експресііі антинематодних dsPHK, а також встановлено їх високу сайленсингову активність в організмі нематод і у інфікованих ними рослин. Ключові слова: полікомпонентні регулятори росту з біозахисною активністю, синтез білків in vivo та у безклітинній системі in vitro, стійкість рослин до паразитичних нематод та патогенних мікроміцетів, антинематодні та антипатогенні si/miPHK, Дот-блот гібридизація між популяціями мРНК та si/miPHK, сайленсингова активність si/miPHK, вектор експресії антинематодних dsPHK, трансгенні РНК-інтерферовані рослини ріпаку. Наукова новизна одержаних результатів. Вперше показано можливість підвищення стійкості рослин до фітопатогенних організмів шляхом індукції процесів РНК-інтерференції

новими полікомпонентними регуляторами росту та за допомогою методів генетичної інженерії. Вперше за допомогою дот-блот гібридизації встановлено значні відмінності ступеню гомології цитоплазматичних мРНК, виділених з клітин зародкової осі насіння квасолі, обробленого регуляторами росту природного та мікробіологічного походження, а також виявлено підвищення функціональної (трансляційної) активності мРНК у безклітинній системі білкового синтезу in vitro. Вперше виявлено вплив регулятору росту Емістим С на підвищення фотосинтетичної активності рослин за умов різної інтенсивності освітлення. Встановлено, що регулятори росту Івін, Емістим, Біолан та Чаркор стимулюють приріст біомаси (в 10-54 рази) та підвищують загальний вміст поліфруктанів (від 7 до 35 разів) у культурах клітин "бородатих коренів" цикорію in vitro, що може вказувати на зміну регуляторами експресії генів фітогормонів, які контролюють ріст коренів та синтез у них цих полісахаридів. Вперше встановлено суттєву різницю між популяціями мРНК та si/miPHK контрольних та оброблених регуляторами росту Біолан, Регоплант та Стімпо проростків цукрового буряку та пшениці, що вирощувались у відсутності патогенних організмів та на штучно створеному нематодами Heterodera schachtii та Meloidogyne incognita, а також мікроміцетом Fusarium oxysporum інфекційних фонах. Вперше виявлено гетерозис-подібний ефект стійкості до патогенних мікроміцетів роду Fusarium L. у другому поколінні рослин пшениці та нуту, отриманих з насіння рослин, що протягом онтогенезу в першому поколінні вирощувались на інфекційному фоні та оброблялись регуляторами росту Біолан, Регоплант та Стімпо. За допомогою дот-блот гібридизації встановлено значні відмінності ступеню гомології між si/miPHK, ізольованих з клітин оброблених регуляторами та мРНК з клітин контрольних рослин. Вперше показано, що полікомпонентний регулятор росту природного походження Регоплант індукує підвищення стійкості рослин каштанів до каштанової мінуючої молі шляхом стимуляції синтезу si/miPHK із захисними властивостями від цього шкідника. Встановлено суттєву різницю ступеню гомології (6-23%) між мРНК та si/miPHK, ізольованих з клітин контрольних та рослин пшениці, огірків і картоплі, вирощених на фоні інфікування патогенними грибами та паразитичними нематодами і оброблених регулятором росту мікробіологічного походження Аверком та його похідними. У безклітинній системі білкового синтезу з проростків пшениці встановлено значне підвищення сайленсингової активності (до 58-65%) si/miPHK з клітин дослідних рослин, оброблених регулятором росту мікробіологічного походження Аверком та його похідними, порівняно з si/miPHK контрольних рослин (до 20%). Вперше встановлено, що регулятор росту природного походження Регоплант значно підвищує в клітинах уражених нематодою H. schachtii рослин синтез малих регуляторних si/miPHK, що мають високу ступінь гомології до фрагменту кДНК консервативної ділянки гену 8H07 цієї нематоди. Вперше за допомогою A. tumefaciens-опосередкованої генетичної трансформації одержано стійкі до нематоди H. schachtii трансгенні рослини ріпаку з вектором конститутивної експресії dsPHK, антисенсових до консервативної ділянки гена 8H07 нематоди H. schachtii. Ступінь упровадження: Розроблено та апробовано технологію підвищення новими полікомпонентними регуляторами росту рослин Регоплант та Стімпо продуктивності та стійкості сільськогосподарських культур: озимої та ярої пшениці, ячменю, сої та кукурудзи до шкідників: хлібного туруна (Zabrus tenebrioides), озимої совки (Scotia segetum), злакових мух (Cloropidae spp.), пшеничної нематоди (Anguina tritici) та фітопатогенних грибів як Mucor spp., Rhizopus spp., Aspergillus spp., Penicillium spp., Trichothecium roseum. Удосконалено технологію підвищення синтезу запасних сполук - поліфруктанів (до 54 разів) у культурах "бородатих коренів" цикорію шляхом додавання до живильного середовища ? МС нових полікомпонентних регуляторів росту природного (Емістим, Біолан, Чаркор) та синтетичного (Івін) походження. Розроблений метод може використовуватись у біотехнологічній практиці для культивування "бородатих коренів" лікарської рослини цикорію для отримання суперсинтезу поліфруктанів, які можуть застосовуватись у харчовій, медичній та фармацевтичній галузях. Запропоновано новий підхід підвищення стійкості рослин ріпаку до фітонематоди H. schachtii за допомогою використання генетично-інженерної технології РНК-інтерференції, яка може застосовуватись у якості альтернативної екологічно безпечної стратегії контролю розповсюдження цього шкідника та зниження спроможності ураження ним важливих для сільського господарства біоенергетичних культур ріпаку. Сфера використання: біотехнологічна галузь

2. The results of investigations concerning possibility of increasing of plant resistance to phytopathogenic organisms using polycomponent growth regulators with natural origin as well as genetic-ingeneering methods, and also genetic and epigenetic mechanisms of improvement of these signs at plants are found out. Using molecular-biological methods it is set that accelerating of germination of haricot bean seeds action of growth regulators Ivin and Radostim is mediated through activation by them of biosynthesis of mRNA, rRNA and proteins. By Dot-blot hybridization method the essential difference in homology degree (to 22 %) between mRNA populations from embryo axis cells of haricot bean seeds treated and untreated with regulators Emistim and Avercom it is set. Influence of growth regulators Emistim C, Radostim, Agrostimulin, Zeastimulin, Biolan is found on increase of protein biosynthesis in cells of 5-day sprouts of haricot bean, pea, soya, barley, wheat and corn plants, and also in cell free system from wheat sprouts on the template poly(A)+RNA from cells of these sprouts. The increase of resistance of some crops to wreckers and pathogenic organisms is established at pre-sowing treatment of seeds and crop spraying by growth regulators in field and greenhouse experiments: Regoplant (up to 98 %), Stimpo (up to 89 %) and Radostim (up to 74 %) which promoted preservation of a crop more than on 80 % comparatively with control. By Dot-blotting mRNA with si/miRNA and study of silencing activity si/miRNA in cell-free system of protein synthesis it is shown the first that resistance of sugar beet plants to nematodes H. schachtii and M. incognita it is reached by stimulation by growth regulators of synthesis in plant cells of antinematodic si/miRNA. The considerable differences (up to 6-23 %) in homology degree between mRNA of control and si/miRNA of experimental wheat, cucumbers and potato plants, infected by pathogenic micromycete F. oxysporum and parasitic nematodes M. incognita and D. destructor and treated by growth regulator Avercom and its derivatives is set; in the cell-free system from wheat sprouts the influence of these regulators on increase of silencing activity of si/miRNA is revealed. Using mediated by A. tumefaciens genetic transformation by constructed vector of dsRNA expression, specific to conservative region of 8H07 gene of root parasitic nematode H. schachtii, the rape plants with the increased resistance to this nematode are obtained.

Державний реєстраційний номер ДіР:

Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки:

Стратегічний пріоритетний напрям інноваційної діяльності:

Підсумки дослідження:

Публікації:

Наукова (науково-технічна) продукція:

Соціально-економічна спрямованість:

Охоронні документи на ОПІВ:

Впровадження результатів дисертації:

Зв'язок з науковими темами:

VI. Відомості про наукового керівника/керівників (консультанта)

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Блюм Ярослав Борисович
2. Blume Yaroslav Borisovich

Кваліфікація: д.б.н., 03.00.01, 03.00.20

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

VII. Відомості про офіційних опонентів та рецензентів

Офіційні опоненти

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Кунах Віктор Анатолійович
2. Кунах Віктор Анатолійович

Кваліфікація: д.б.н., 03.00.15, 03.00.15

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Дробик Надія Михайлівна
2. Дробик Надія Михайлівна

Кваліфікація: д.б.н., 03.00.20

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Тищенко Олена Миколаївна
2. Тищенко Олена Миколаївна

Кваліфікація: д.б.н., 03.00.12, 03.00.15

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Рецензенти

VIII. Заключні відомості

Власне Прізвище Ім'я По-батькові голови ради	в.о. голови спеціалізованої вченої ради Циганков Сергій Петрович
Власне Прізвище Ім'я По-батькові головуючого на засіданні	в.о. голови спеціалізованої вченої ради Циганков Сергій Петрович
Відповідальний за підготовку облікових документів	
Реєстратор	

Керівник відділу УкрІНТЕІ, що є відповідальним за реєстрацію наукової діяльності



Юрченко Т.А.