

ІНСТИТУТ КЛІТИНОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
“КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ ІГОРЯ
СІКОРСЬКОГО” МОН УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Потрохов Андрій Олександрович

УДК 60.604

ДИСЕРТАЦІЯ

**ВИЗНАЧЕННЯ ВІРУСОСТІЙКОСТІ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН
РОДИНИ SOLANACEAE, ТРАНСФОРМОВАНИХ
ГЕТЕРОЛОГІЧНИМИ ГЕНАМИ
03.00.20 Біотехнологія**

Подається на здобуття наукового
ступеня: кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне
джерело _____ А.О. Потрохов

Науковий керівник Матвєєва Надія Анатоліївна, доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник

Київ – 2024

АНОТАЦІЯ

Потрохов А.О. Визначення вірусостійкості трансгенних рослин родини Solanaceae, трансформованих гетерологічними генами. – Кваліфікаційна наукова праця правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 «біотехнологія» – Інститут клітиної біології та генетичної інженерії НАН України, Національний технічний університет України “Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського” МОН України, Київ, 2024.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню вірусостійких трансгенних рослин родини Solanaceae з різними гетерологічними генами.

Мета та завдання дослідження. Вивчення вірусостійкості трансгенних рослин родини Solanaceae з гетерологічними перенесеними генами до РНК вмісних вірусів рослин.

Об’єкт дослідження — вірусостійкість трансгенних рослин родини Solanaceae до РНК вірусів рослин.

В роботі було досліджено можливість використання генів різного походження для створення вірусостійких трансгенних рослин родини Solanaceae на прикладі рослин *Nicotiana tabacum* L, *Nicotiana bethamiana* L, *Petunia*×*hybrida* hort. ex E. Vilm. та *Solanum tuberosum* L. Такий вибір рослин обумовлений тим, що *N. tabacum*, *N. bethamiana* вважають ідеальними модельними об’єктами для вірусологічних та генетичних досліджень. Рослини *Petunia*×*hybrida* останнім часом набувають великого значення як новий модельний об’єкт досліджень, окрім того вони широко використовуються в промисловому садівництві. Рослини *S. tuberosum* виступають в даних дослідженнях, як цінний промисловий вид, який є важливим для економіки України та світу.

Автор зазначає, що трансформовані рослини петунії та картоплі були отримані раніше і взяті в дану роботу для вірусологічних досліджень. Автор особисто провів генетичну трансформацію рослини *N. tabacum* та *N. bethamiana* з використанням векторних конструкцій з генами *inf α -2b* та *ZRNase II*. Трансгенні рослини *N. bethamiana* з геном *ZRNase II* були використані для створення модельної системи вірус-рослина та оцінки розвитку системної вірусної інфекції.

В роботі представлено результати молекулярно-біологічних, біохімічних та вірусологічних досліджень. Інфікування рослин проводили, використовуючи вірус картоплі Y (PVY), вірус тютюнової мозаїки (TMV) та векторну конструкцію з елементами вірусу картоплі X та флуоресцентного білка GFP. Використання векторної конструкції з елементами вірусу і репортерним білком GFP дозволило візуалізувати розповсюдження вірусу в трансгенних рослинах і оцінити розвиток системної реакції.

На початкових етапах роботи методом агробактеріальної трансформації були отримані рослини *N. tabacum* з геном *inf α -2b*. Проведена полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР) підтвердила наявність цільового гена. Методом Кербера було показано, що екстракти трансгенних рослин з геном *inf α -2b* виявляли активність інтерферону на культурі клітин перевивних тестикул поросят інфікованих вірусом везикулярного стоматиту. Незважаючи на активність білкового продукту гена *inf α -2b*, після інфікування трансгенних рослин TMV не було виявлено ознак зміни розвитку інфекційного процесу. Трансгенні рослини *N. tabacum* з геном *inf α -2b* не характеризувалися зміненою віросостійкістю до фітовірусу. Однак, за рядом біохімічних параметрів, а саме змінами антиоксидантної активності (АОА) та перекисневого окислення ліпідів (ПОЛ) трансгенні рослини характеризувалися тенденцією до підвищення

стресостійкості. Електронне мікроскопічне дослідження трансгенних рослин *N. tabacum* не виявило змін ультраструктури клітин у порівнянні з ультраструктурою клітин рослин дикого типу. Генетична трансформація чужорідним геном не призводила до патології в клітинах рослин. Патологічні зміни в клітинах трансгенних рослин, які були інфіковані TMV не відрізнялися від змін в уражених клітинах рослинах дикого типу. Таким чином, було показано що, трансформація рослин тютюну геном *inf-α2b* не призводила до змін вірусостійкості рослин, навіть незважаючи на противірусну активність екстрактів на культурі клітин тварин. В подальшому було досліджено можливість застосування інших генів, а саме генів рибонуклеаз, для створення віростійких рослин.

Рослини *S. tuberosum* та *Petunia*×*hybrida* були взяті з колекції трансгенних рослин Інституту клітинної біології та генетичної інженерії. Методом ПЛР було підтверджено, що, незважаючи на тривале зберігання в колекції, досліджувані рослини зберігали цільові гени. В результаті були відібрані сорти картоплі Ласунак та Лугівська, лінії яких містили гени *bov* (ген отриманий з *Bos taurus*) та *ZRNase II* (ген отриманий з рослин *Zinnia elegans*), а також відібрані лінії гібридних сортів петунії M1 та P5 з геном *ZRNase II*. ПЛР підтвердив наявність гена *ZRNase II* в трансформованих рослин *N. benthamiana*, які були отримані в процесі роботи.

Подальші дослідження проводили з рослинами, які вирощувалися в ґрунті. Перед початком експериментів усі дослідні рослини були акліматизовані до умов *ex vitro*. В досліджуваних рослинах визначали загальну РНКазну активність.

Було досліджено загальну РНКазну активність в трансгенних лініях сортів картоплі Лугівська та Ласунак та у рослинах дикого типу толерантного сорту Слов'янка. Аналіз показав, що серед вихідних рослин дикого типу найбільша активність виявлена в толерантному сорті Слов'янка.

Виявлено, що в трансгенних рослинах загальна РНКазна активність була вищою порівняно з такою активністю у рослин дикого типу. В рослинах сорту Лугівська, що містять ген *ZRNase II*, активність була найвища серед усіх трансгенних рослин картоплі.

Аналіз загальної РНКазної активності у рослинах *Petunia*×*hybrida* виявив, що активність РНКазна була вищою у трансгенних рослинах. Загальна активність РНКаз у різних трансгенних ліній сорту P5 перевищувала в 1,83-2,10 рази активність в рослинах дикого типу. У трансгенних рослин M1 активність була в 1,34-1,85 рази вищою, ніж у рослин дикого типу.

Було встановлено, що у рослинах *N. benthamiana* загальна активність РНКаз у трансгенних рослин була у 4-6 разів вища ніж у рослин дикого типу.

Для проведення аналізу чутливості рослин до вірусів проводили їх інфікування. Інфікування трансгенних рослин, проводили методом інокуляції вірусомісного препарату PVY (картопля), або TMV (петунія) шляхом механічного втирання в поверхню листкової пластинки. В якості контролю використовували рослини дикого типу. Після появи виражених симптомів інфекції проводили їх візуальний аналіз.

В контрольних рослинах *S. tuberosum* симптоми інфекції PVY включали: скручування нижніх листків, жовті плями на листках, некроз стебел і жилок, концентричні некрози, затримку росту. Серед вихідних рослин найменш виражені симптоми були в рослинах толерантного сорту Слов'янка. В трансгенних рослинах симптоматична картина була менш вираженою та була пролонгована. Трансгенні рослини *S. tuberosum* з геном *ZRNase II* продемонстрували відстрочені або менш помітні симптоми вірусної інфекції у порівнянні з трансгенними рослинами з геном *bov*.

Рослини *Petunia*×*hybrida* дикого типу, інфіковані TMV, вже на третій тиждень почали проявляти симптоми ураження: мозаїка на листі, крапчастість, деформація листкових пластинок. Причому симптоми були більш яскраво виражені у рослин сорту М1. Симптоматична картина інфекції для сорту Р5 виражалася лише у легкій зморшкуватості листя. В трансгенних рослинах М1 та Р5 симптоми почали з'являтися лише на 4-5 тиждень.

Оскільки візуальна діагностика не може вважатися надійним ефективним методом детекції вірусів, для достовірного підтвердження ураження рослин було проведено імуноферментний аналіз (ІФА).

Визначення антигенів PVY проводили в модифікації «сендвіч» ІФА. Результати аналізу виявили різні рівні накопичення вірусного антигена. Найбільш чутливим був сорт Ласунак, а найбільш толерантним – Слов'янка. В дослідних лініях трансгенних рослин з геном *bov* достовірної різниці у рівні вірусних антигенів порівняні з рослинами дикого типу виявлено не було. У трансгенних рослин сорту Лугівська з геном *ZRNase II* рівень накопичення вірусу був найнижчий серед усіх досліджуваних рослин.

Накопичення вірусного антигена TMV в рослинах петунії аналізували методом непрямого ІФА. У трансгенних лініях сорту М1 кількість вірусного антигена була у 3,3 – 4,0 менша ніж у вихідних рослин дикого типу. В рослинах сорту Р5 кількість антигена була у 1,62 рази менше порівняно з контролем.

Як і рослини *N. tabacum*, рослини петунії за біохімічними показниками ПОЛ та АОА проявляли тенденцію до розвитку стресостійкості до вірусної інфекції викликаній TMV. В інфікованих рослинах дикого типу, фітовірусна інфекція спричинювала стимулювання ПОЛ та активацію метаболічних процесів та розвиток стрес-реакцій. В

трансгенних рослинах спостерігали активізацію процесів АОА та розвиток захисних реакцій.

Оскільки рослини *Petunia*×*hybrida* не дають чітко вираженої системної реакції ТМV для дослідження впливу гена *ZRNase II* на системне поширення вірусів в трансгенних рослинах була розроблена тест система вірус-рослина з використанням модельних рослин *N. benthamiana* з геном *ZRNase II*.

В трансгенні рослини *N. benthamiana* з геном *ZRNase II* була інфільтрована векторна конструкція, що містила в своєму складі елементи вірусу картоплі Х та репортерний ген *gfp*. Продукт гена *gfp* можна візуально ідентифікувати в ультрафіолетовому спектрі, що дозволяє оцінити розповсюдження вірусу по рослині у реальному часі. В результаті дослідження було встановлено, що світіння GFP спочатку з'являлося в сайті первинної інфільтрації. Системне поширення вірусних частинок в рослинах дикого типу спостерігали на другий тиждень після інфільтрації. GFP детектували в молодих листках, судинних пучках, зокрема в районі центральних та бічних жилочок. В трансгенних лініях рослин розвиток системної вірусної реакції був сповільнений. В цих рослинах було відміченою появу нових сигналів в місцях, відмінних від первинної зони інфільтрації, через 2-3 тижнів після візуалізації активної флуоресценції в рослинах дикого типу.

Аналіз співвідношення антоціанів до хлорофілів в системі вірус-рослина показав, що в трансгенних рослинах цей показник був в 2 рази нижчим порівняно з рослинами дикого типу. Це може бути свідченням більш ефективної роботи антиоксидантної систем в трансгенних лініях тютюну.

Таким чином, в результаті проведеної роботи було встановлено, що на відміну від використання гена *inf α2b*, гени екстраклітинних рибонуклеаз

дозволяють отримувати рослини з модифікованою стійкістю до вірусів. У таких трансгенних рослин пригнічується розвиток вірусної інфекції, хоча і не спостерігається повна його елімінація. З представлених в даному дослідженні підходів оптимальним є використанням генів рибонуклеаз рослинного походження.

Ключові слова: трансгенні рослини, Solanaceae, стійкість до вірусів, системна вірусна реакція, гетерологічні гени.

SUMMARY

Potrokhov A.O. «Determination of virus resistance of transgenic plants of the Solanaceae transformed with heterologous genes». – Qualifying research paper on manuscript rights.

Dissertation for obtaining the scientific degree of candidate of biological sciences in the specialty 03.00.20 "biotechnology". – Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, National Technical University of Ukraine "Ihor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute" of the Ministry of Education and Culture of Ukraine, Kyiv, 2024.

The dissertation is devoted to the study of virus-resistant transgenic plants of the Solanaceae with various heterologous genes.

The purpose of the work is to study the virus resistance of transgenic plants of the Solanaceae with various heterologous genes.

The object of the research is the virus resistance of a plant of the Solanaceae.

The paper investigated the possibility of using genes of different origins to create virus-resistant transgenic Solanaceae plants: *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana bethamiana*, *Petunia*×*hybrida* and *Solanum tuberosum*.

N. tabacum, *N. bethamiana* are considered ideal model objects for virological and genetic research. *Petunia*×*hybrida* plants have recently gained

great importance as a new model object of research, in addition, they are widely used in industrial horticulture. *S. tuberosum* plants appear in these studies as a valuable industrial species.

The author notes that transformed petunia and potato plants were obtained earlier and included in this work for virological research. The author personally carried out the genetic transformation of *N. tabacum* and *N. bethamiana* plants using vector constructs with *inf α -2b* and *ZRNase II* genes. Transgenic plants of *N. bethamiana* with the *ZRNase II* gene were used to create a virus-plant model system and evaluate the development of systemic viral infection.

The work presents the results of molecular biological, biochemical and virological research.

At the initial stages of the work, *N. tabacum* plants with the *inf- α 2b* gene were obtained by the method of agrobacterial transformation. Polymerase chain reaction (PCR) confirmed the presence of the target gene. Using Kerber's method, it was shown that extracts of transgenic plants with the *inf- α 2b* gene showed interferon activity in the culture of cells of the testicles of piglets infected with the vesicular stomatitis virus. Despite the protein activity no signs of changes in the development TMV infection in transgenic plants were detected. Transgenic *N. tabacum* plants with the *inf- α 2b* gene were not characterized by altered resistance to the plant virus. However transgenic plants were characterized by a tendency to increase stress resistance, according to biochemical parameters (antioxidant activity (AOA) and lipid peroxidation (LPO)).

Genetic transformation with a foreign gene did not lead to pathology in plant cells. Electron microscopic examination of transgenic *N. tabacum* did not reveal changes in the ultrastructure of cells compared to the ultrastructure of cells of wild-type plants. Pathological changes in transgenic cells that were

infected by TMV did not differ from changes in infected cells of wild-type plants. Thus, it was shown that the transformation of tobacco plants with the *inf-α2b* gene did not lead to changes in plant virus resistance, even despite the antiviral activity of extracts on animal cell culture.

The transgenic *S. tuberosum* and *Petunia*×*hybrida* plants were taken from plant collection of the Institute of Cell Biology and Genetic Engineering. PCR method confirmed the presence of the target gene. As a result, potato varieties Lasunak and Luhivska were selected, the lines of which contained *bov* genes (a gene obtained from *Bos taurus*) and *ZRNase II* (a gene obtained from *Zinnia elegans* plants), as well as lines of hybrid petunia varieties M1 and P5 with the *ZRNase II* gene were selected. In addition, PCR confirmed the presence of the *ZRNase II* gene in the transformed plants of *N. benthamiana*, which were obtained during the work.

All experimental plants were acclimatized to *ex vitro* conditions. The total RNase activity was determined in the plants after acclimatization.

The total RNase activity was investigated in transgenic lines of Luhivska and Lasunak and in wild-type plants of the tolerant variety Slovyanka. The analysis showed that among the original wild-type plants, the tolerant variety Slovyanka showed the greatest activity. It was found that the total RNase activity in transgenic plants was higher compared to wild-type plants. In plants of the Luhivska containing the *ZRNase II* gene, the activity was the highest among all transgenic potato plants.

The total RNase activity in transgenic *Petunia*×*hybrida* plants was higher than RNase activity in non-transgenic plants. In various transgenic lines of the P5 the activity was 1.83-2.10 higher than in wild-type plants. In transgenic M1 plants, the activity was 1.34-1.85 higher than in wild-type plants.

RNase activity in transgenic *N. benthamiana* plants was 4-6 times higher than in wild-type plants.

Transgenic plants were infected by PVY (potato) or TMV (petunia) by mechanical rubbing into the surface of the leaf blade. Wild-type plants were used as controls. After the appearance of pronounced symptoms of infection, they were visually analyzed.

In control plants of *S. tuberosum*, symptoms of PVY infection included: curling of lower leaves, yellow spots on leaves, necrosis of stems and veins, concentric necrosis, and growth retardation. Among the starting plants, the least severe symptoms were in the plants of the tolerant variety Slovianka. In transgenic plants, the symptomatic picture was less pronounced and prolonged. Transgenic plants of *S. tuberosum* with the *ZRNase II* gene showed delayed or less severe symptoms of virus infection compared to transgenic plants with the *bov* gene.

Wild-type *Petunia×hybrida* plants infected by TMV began to show damage symptoms already in the third week: leaf mosaic, speckling, deformation of leaf plates. Moreover, the symptoms were more pronounced in the M1 variety. The symptomatic picture of the infection for the P5 variety was expressed only in a slight wrinkling of the leaves. In transgenic plants M1 and P5, symptoms began to appear only after 4-5 weeks.

Since visual diagnostics cannot be considered a reliable and effective method of virus detection, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to reliably confirm plant damage.

Determination of PVY antigens was carried out in a modified "sandwich" ELISA. Based on the results of the analysis, different levels of viral antigen accumulation were observed. The most susceptible variety was Lasunak, and the most tolerant was Slovianka. In experimental lines of transgenic plants with the *bov* gene, no significant difference in the level of viral antigens compared to wild-type plants was found. In transgenic plants of the Luhivska with the

ZRNase II gene, the level of virus accumulation was the lowest among all the studied plants.

Accumulation of viral antigen TMV in petunia plants was analyzed by indirect ELISA. In the transgenic lines of the M1 variety, the amount of viral antigen was 3.3-4.0 less than in the original wild-type plants. In plants of the P5 variety, the amount of antigen was 1.62 times less compared to the control.

Petunia plants showed a tendency to develop stress resistance to TMV virus infection according to the biochemical indicators of LPO and AOA. In infected wild-type plants, plant virus infection caused stimulation of LPO and activation of metabolic processes and development of stress responses. Activation of AOA processes and the development of protective reactions were observed in transgenic plants.

Since *Petunia×hybrida* plants do not give a well-defined systemic response to TMV, a virus-plant test system using model plants *N. benthamiana* with the *ZRNase II* gene was developed to study the effect of the *ZRNase II* gene on the systemic spread of viruses in transgenic plants.

A vector construct containing elements of the potato virus X and the *gfp* reporter gene was infiltrated into the transgenic *N. benthamiana* plant with the *ZRNase II* gene. The product of the *gfp* gene can be visually identified in the ultraviolet spectrum, which allows to assess the spread of the virus on the plant in real time. As a result of the study, it was established that GFP glow first appeared at the site of primary infiltration. Systemic spread of viral particles in wild-type plants was observed in the second week after infiltration. GFP was detected in young leaves, vascular bundles, in particular in the central and lateral veins. In transgenic plant lines, the development of the systemic virus reaction was slowed down. In these plants, the appearance of new signals in places other than the primary infiltration zone was noted 2-3 weeks after visualization of active fluorescence in wild-type plants. Analysis of the ratio of

anthocyanins to chlorophylls in the virus-plant system showed that in transgenic plants this indicator was 2 times lower compared to wild-type plants. This may be evidence of more efficient work of antioxidant systems in transgenic tobacco lines.

Thus, as a result of the work carried out, it was established that, unlike the use of the *inf- α 2b* gene, extracellular ribonuclease genes make it possible to obtain plants with modified resistance to viruses. In such transgenic plants, the development of viral infection is inhibited, although its complete elimination is not observed. Of the ones presented in this study methods, the use of ribonuclease genes of plant origin is optimal.

Key words: transgenic plants, Solanaceae, resistance to viruses, systemic viral response.

Список опублікованих праць за темою дисертації
Статті в наукових періодичних фахових виданнях України

1. **Потрохов А. О.** Антиоксидантна активність трансгенних рослин *Nicotiana tabacum* L з геном *ifn- α 2b* людини, інфікованих вірусом тютюнової мозаїки. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол.* 2015, № 2(63) С 58-64. (Категорія Б) (відбір матеріалу, проведення досліджень, участь в узагальненні отриманих даних і написанні статті)
2. **Потрохов А. О.,** Зубр З. В, Трохименко О. П., Матвєєва Н. А. Оцінка противірусної активності екстрактів із трансгенних рослин тютюну з геном інтерферону α -2b людини. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол.* 2017. 3(70) С.64-69. (Категорія Б) (відбір матеріалу, проведення досліджень, узагальнення отриманих даних і написання статті)
3. **Потрохов А.О.,** Сосновська Д.І., Овчаренко О.О. Антиоксидантна активність петуній із геном гетерологічної рибонуклеази *ZRNase II*, інфікованих вірусом тютюнової мозаїки. *Innov Biosyst Bioeng.* 2022. 6(1). С. 40–45. doi: 10.20535/ibb.2022.6.1.254464; **Q4 Scopus** (Категорія А) (відбір матеріалу, проведення досліджень, участь в узагальненні отриманих даних і написанні статті)
4. **Потрохов А.,** Овчаренко О. Стратегії створення стійких до вірусів рослин: фокус на РНКзах. *Цитологія і генетика.*2024. 58(2). С.24-43. **Q3 Scopus** (Категорія А) (аналіз наукової літератури, участь у написанні статті)

Статті в інших наукових виданнях

5. **Potrokhov A.,** D. Klymchuk, Yu. Akimov, N. Matvieieva, E. Trokhimenko, I. Dzubylyk, M. Kuchuk Ultrastrucrural characteristics of

mezophyll cells of transgenic tobacco plants with human interferon alpha 2b gene infected by tobacco mosaic virus. *Genetics and Plant Physiology*. 2014. 4(3-4). P. 174–181 (відбір матеріалу, проведення досліджень, участь в узагальненні отриманих даних і написанні статті)

6. **Potrokhov A**, Sosnovska D, Ovcharenko O, Budzanivska I, Rudas V, Kuchuk M. Increased ribonuclease activity in *Solanum tuberosum* L. transformed with heterologous genes of apoplastic ribonucleases as a putative approach for production of virus resistant plants. *Turk J Biol*. 2021. 45(1). P. 79-87. doi: 10.3906/biy-2007-87. **Q2 Scopus**; (відбір матеріалу, проведення досліджень, участь в узагальненні отриманих даних і написанні статті)
7. Ovcharenko O., **Potrokhov A.**, Sosnovska D., Hoysyuk Y, Yaroshko O, Shevchenko T, Budzanivska I., Rudas V., Kuchuk M. Increased virus resistance in transgenic petunia with heterologous *ZRNase II* gene. *Jordan Journal of Biological Sciences*. 2023. 16(4). P. 587 – 592. <https://doi.org/10.54319/jjbs/160403> **Q3 Scopus**; (відбір матеріалу, проведення досліджень, участь в узагальненні отриманих даних і написанні статті)

Матеріали та тези доповідей конференцій

8. Sosnovskaya D.O., **Potrochov A.A.**, Ovcharenko O.O., Rudas V.A., Kuchuk M.V. Analysis of RNase activity and resistance to Potato virus Y in transgenic potato lines containing bovine pancreatic RNase cDNA International conference “Bioresource and viruses” September 9-11,2019, Kiev, Ukraine p.98.
9. **Potrokhov A.**, Ovcharenko O. Antioxidant activity of transgenic *Petunia hybrida* Vilm. with heterologous *ZRNase II* gene after tobacco mosaic virus infection. 5th International Scientific Conference Agrobiodiversity for Improving the Nutrition, Health, Quality of Life and Spiritual Human

- Development. November 3rd, 2021, Nitra, p.108.
<https://doi.org/10.15414/2021.9788055224015>
10. Гойсюк Ю.Ю., **Потрохов А.О.**, Овчаренко О.О., Моргун Б.В. Створення трансгенного тютюну з геном екстраклітинної рибонуклеази цинії як модельного об'єкта для вивчення стійкості до широкого спектру вірусів рослин біотехнологія XXI століття. Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття», 20 травня 2020, Київ, с.25.
11. **Potrokhov A.**, Ovcharenko O. Transgenic petunia with *ZRNase II* gene as a novel model system for investigation of virus resistance International Scientific Conference Innovation in Science: Global Trends and Regional Aspect: Conference Proceedings, March 12-13, 2021, Riga, p. 6-8.
<https://doi.org/10.30525/978-9934-26-050-6-3>
12. Сосновська Д. І., **Потрохов А. О.**, Овчаренко О. О. "Використання генів гетерологічних рибонуклеаз для підвищення стійкості рослин до фітовірусів." XV Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія XXI століття» присвячена 20-річчю Факультету біотехнології і біотехніки КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2021, Київ, с 94.
13. Sosnovska D., Yuliya Hoysyuk, Olha Yaroshko, **Andrii Potrokhov**, Tetiana Shevchenko, Irena Budzanivska, Olga Ovcharenko, Mykola Kuchuk "Increased virus resistance in transgenic petunia with heterologous *ZRNase II* gene" SEAB 2021, July 01-03, 2021 p. 280.
14. **Potrokhov A. O.**, Solomka O. S., Yaroshko O. M., Ovcharenko O. O. Obtaining of transgenic *Nicotiana benthamiana* plants with heterologous *ZRNase II* gene to produce a model for study of influence of extracellular ribonucleases on plant resistance to virus movement Mendel Genetics

- Conference. A tribute to Gregor Johann Mendel on the bicentennial of his birth. July 20—23, 2022, Brno, p. 159.
15. Serazhym A.Y., **Potrohov A.O.**, Ovcharenko O.O. Peculiarities of the development of systemic viral reactions in *Nicotiana benthamiana* plants expressing the heterologous *ZRNase II* gene. X International Conference,, Bioresources and Viruses“ September 11-13, 2023, Kyiv, p. 83.
16. **Потрохов А.О.**, Матвеева Н.А. Перенесення гена інтерферону- $\alpha 2b$ людини в рослини *Nicotiana tabacum* L Біоресурси і віруси 10-13.09, 2013, Київ, с.56.
17. **Потрохов А.О.**, Матвеева Н.А. Дослідження антиоксидантної активності та вмісту фруктанів у трансгенних рослинах *Nicotiana tabacum* L. з геном *ifn- $\alpha 2b$* людини, інфікованих вірусом тютюнової мозаїки. Друга конференція молодих учених Біологія рослин та біотехнологія .ІХБГ 23-24.12- 2013, Київ, с. 66.
18. Ісаєва Є.В., Лісняк А.А., Трохименко О.П., **Потрохов А.О.**, Дробот К.О., Матвеева Н.А. Противірусна дія екстрактів з бородатих коренів рослин, що мають ген інтерферону- $\alpha 2b$ людини. ІХ Всеукраїнська науково-практична конференції «Біотехнологія ХХІ століття» 24 квітня 2015, Київ, с.45.
19. Ісаєва Є.В., Лісняк А.А., Трохименко О.П., **Потрохов А.О.**, Дробот К.О., Матвеева Н.А. Противірусна дія рекомбінантного інтерферону- $\alpha 2b$ людини з екстрактів трансгенних коренів рослин різних видів. ІV Всеукраїнсько науково-практична конференція Біотехнологія: звершення та надії конференції 21-22 травня 2015, Київ, с. 56-57.

ЗМІСТ

| | |
|---|------|
| | стор |
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ | 22 |
| ВСТУП | 26 |
| РОЗДІЛ 1 Огляд літератури | 34 |
| 1.1 Основні механізми взаємодії вірус-рослина та способи створення вірусостійких рослин | 34 |
| 1.1.1 Взаємодія вірус-рослина | 34 |
| 1.1.2 Стратегії створення вірусостійких рослин | 41 |
| 1.1.3 Характеристика рибонуклеаз | 49 |
| 1.1.4 Використання рибонуклеаз для створення трансгенних вірусостійких рослин | 52 |
| 1.2 Об'єкти дослідження | 60 |
| 1.3 Характеристика вірусу тютюнової мозаїки | 62 |
| 1.4 Характеристика Y- вірусу картоплі | 63 |
| Висновок до розділу 1 | 65 |
| РОЗДІЛ 2 Матеріали та методи досліджень | 66 |
| 2.1 Вихідний матеріал | 66 |
| 2.2 Поверхнева стерилізація насіння рослин <i>N. benthamiana</i> та <i>N. tabacum</i> . | 66 |
| 2.3 Субкультивування рослин <i>in vitro</i> | 67 |
| 2.4 Культивування бактерій <i>A. tumefaciens</i> | 67 |
| 2.5 Генетичні конструкції, які були використані в роботі | 68 |
| 2.6 Генетична трансформація рослин | 69 |
| 2.7 Визначення селективної концентрації антибіотика канаміцину для відбору трансформованих рослин | 70 |
| 2.8 Виділення загальної ДНК трансформованих рослин | 70 |
| 2.9 Проведення полімеразної ланцюгової реакція | 71 |

| | |
|---|-----------|
| 2.10 Виявлення послідовностей мРНК генів RNS ЗТ-ПІР у трансгенних рослинах петунії | 72 |
| 2.11. Виявлення послідовностей мРНК TMV в інфікованих рослинах <i>N. tabacum</i> | 73 |
| 2.12 Адаптація та вирощування рослин у тепличних умовах | 74 |
| 2.13 Інокуляція рослин вірусомісним матеріалом | 75 |
| 2.14 Визначення присутності вірусу в інфікованих рослинах та проведення імунноферментного аналізу | 76 |
| 2.15 Визначення вмісту продуктів ПОЛ та АОА в інфікованих рослинах | 78 |
| 2.16 Визначення РНКазної активності | 79 |
| 2.17 Визначення особливостей розвитку системної вірусної реакції у рослин <i>Nicotiana benthamiana</i> , що експресують ген ZRNase II | 80 |
| 2.18 Визначення співвідношення антоціанів до хлорофілів в рослинах <i>Nicotiana benthamiana</i> , що експресують ген ZRNase II | 81 |
| 2.19 Визначення метаболітів в трансгенних рослинах петунії та тютюну з використанням методу інфрачервона спектроскопії | 82 |
| 2.20 Електронна мікроскопія інфікованих клітин <i>N. tabacum</i> | 84 |
| 2.21 Визначення противірусної активності екстрактів рослин <i>N. tabacum</i> з геном <i>ifn-α2b</i> | 85 |
| 2.22 Статистична обробка | 86 |
| РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ І ЇХ ОБГОВОРЕННЯ | 87 |
| 3.1 Дослідження трансгенних рослин <i>N. tabacum</i> з геном інтерферону α 2в людини | 87 |
| 3.1.1 Трансформації рослин <i>N. tabacum</i> геном інтерферону α 2в людини | 87 |
| 3.1.2 Молекулярно-біологічний аналіз рослин <i>N. tabacum</i> | 88 |

| | | |
|--------------------------------|---|-----|
| 3.1.3 | Визначення інтерферон-подібної активності екстрактів рослин <i>N. tabacum</i> з геном <i>ifn-α2b</i> людини | 89 |
| 3.1.4 | Інфікування рослин <i>N. tabacum</i> та їх аналіз | 91 |
| 3.1.5 | Дослідження ультраструктури клітин інфікованих рослин <i>N. tabacum</i> | 94 |
| 3.1.6 | Оцінка розвитку стресових реакцій у інфікованих рослин <i>N. tabacum</i> | 96 |
| Висновки до розділу 3.1 | | 98 |
| 3.2 | Дослідження трансгенних рослин <i>Solanum tuberosum</i> | 98 |
| 3.2.1 | Молекулярно-біологічний аналіз рослин <i>S. tuberosum</i> | 100 |
| 3.2.2 | Адаптація <i>S. tuberosum</i> до тепличних умов та їх вирощування | 102 |
| 3.2.3 | Визначення загальної РНказної активності в трансформованих рослинах <i>S. tuberosum</i> | 103 |
| 3.2.4 | Інфікування рослин <i>S. tuberosum</i> PVY та підтвердження ураження | 106 |
| 3.2.5 | Імуноферментний аналіз інфікованих рослин <i>S. tuberosum</i> | 109 |
| Висновок до розділу 3.2 | | 110 |
| 3.3 | Дослідження трансгенних рослин <i>Petunia</i> × <i>hybrida</i> | 110 |
| 3.3.1 | Молекулярно-біологічний аналіз рослин <i>Petunia</i> × <i>hybrida</i> | 112 |
| 3.3.2 | Адаптація <i>Petunia</i> × <i>hybrida</i> до тепличних умов та їх вирощування | 114 |
| 3.3.3 | Визначення РНказної активності в трансформованих рослинах | 116 |
| 3.3.4 | Ураження рослин <i>Petunia</i> × <i>hybrida</i> та підтвердження ураження | 118 |
| 3.3.5 | Імуноферментний аналіз уражених рослин <i>Petunia</i> × <i>hybrida</i> | 120 |
| 3.3.6 | Оцінка розвитку стресових реакцій у рослин | 125 |

| | |
|---|-----|
| <i>Petunia</i> × <i>hybrida</i> | |
| Висновки до розділу 3.3 | 125 |
| 3.4 Дослідження трансгенних рослин <i>Nicotiana benthamiana</i> | 126 |
| 3.4.1 Уведення в культуру <i>in vitro</i> рослин <i>N. benthamiana</i> та їх субкультивування | 126 |
| 3.4.2 Генетична трансформація рослин <i>N. benthamiana</i> | 128 |
| 3.4.3 Проведення полімеразної ланцюгової реакції рослин <i>N. benthamiana</i> | 129 |
| 3.4.4 Адаптація <i>N. benthamiana</i> до тепличних умов та їх вирощування | 130 |
| 3.4.5 Визначення РНказної активності в трансформованих рослинах <i>N. benthamiana</i> | 130 |
| 3.4.6 Опосередкована GFP візуалізація взаємодії вірус-рослина | 131 |
| 3.4.7 Визначення співвідношення антоціанів до хлорофілів в трансгенних рослинах <i>N. benthamiana</i> | 133 |
| 3.4.8 ІЧ спектроскопія рослин <i>N. benthamiana</i> | 136 |
| Висновки до розділу 3.5 | 140 |
| УЗАГАЛЬНЕННЯ | 141 |
| ВИСНОВКИ | 148 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ | 150 |
| ДОДАТКИ | 177 |

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

PAMPs – Patogen Associated Molecular Patterns

PRRs – Pattern Recognition Receptors

RLK – Receptor Like Kinases

NB – Nucleotide-Binding domain

LRR – Leicine Rich Repeats

DAMP – Damage Associated Molecular Patterns

NLR – Nucleotide-Binding Domain

HR – Hypersensitive Response

AMCV – *Artichoke mottled crinkle virus*

AMV – *Alfalfa mosaic virus*

BaMV – *Bamboo mosaic virus*

BGMV – *Bean golden mosaic virus*

BMV – *Brome mosaic virus*

BYDV – *Barley yellow dwarf virus*

CABMV – *Cowpea aphid-borne mosaic virus*

CBSV – *Cassava brown streak virus*

CasMV – *Cassava mosaic virus*

CIYVV – *Clover yellow vein virus*

CMV – *Cucumber mosaic virus*

CVV – *Citrus variegation virus*

LMV – *Lettuce mosaic virus*

PLRV – *Potato leaf roll virus*

PMMoV – *Pepper mild mottle virus*

PVX – *Potato virus X*

PVY – *Potato virus Y*

RBSDV – *Rice black-streaked dwarf virus*

SBWMV – *Soil-borne wheat mosaic virus*

TBSV – *Tomato bushy stunt virus*

TCSV – *Tomato chlorotic spot virus*

TCV – *Turnip crinkle virus*

TEV – *Tobacco etch virus*

TMV – *Tobacco mosaic virus*

ToBRFV – *Tomato brown rugose fruit virus*

ToMV – *Tomato mosaic virus*

TSWV – *Tomato spotted wilt orthospovirus*

TSWY – *Tomato spotted wilt orthospovirus*

TuMV – *Turnip mosaic virus*

TYMV – *Turnip yellow mosaic virus*

WSMoV – *Watermelon silver mottle virus*

RBP_s – RNA binding protein

RIP_s – Ribosome inactivating proteins

PR-білки – Pathogenesis Related

ACMV – *African cassava mosaic virus*,

ArMV – *Arabis mosaic virus*,

BBrMV – *Banana bract mosaic virus*,

BBTV – *Banana bunchy top virus*,

BCMV – *Bean common mosaic virus*,

BCTV – *Beet curly top virus*

BNYVV – *Beet necrotic yellow vein virus*

BPMV – *Bean pod mottle virus*

BSCTV – *Beet severe curly top virus*

BSMV – *Barley stripe mosaic virus*

BeYDV – *Bean yellow dwarf virus*

BYMV – *Bean yellow mosaic virus*

ChiVMV – *Chilli veinal mottle virus*
CSVd – *Chrysanthemum stunt viroid*
CTV – *Citrus tristeza virus*
CymMV – *Cymbidium mosaic virus*
ICRSV – *Indian citrus ringspot virus*
CYVV – *Clover yellow vein virus*
JMV – *Johnson grass mosaic virus*
MDV – *Maize dwarf virus*
MeMV – *Merremia mosaic virus*
MSV – *Maize streak virus*
MYMIV – *Mungbean yellow mosaic India virus*
ORSV – *Odontoglossum ringspot virus*
PMV – *Pokeweed mosaic virus*
PNRV – *Prunus necrotic ringspot virus*
PPV – *Plum pox virus*
PRSV – *Papaya ringspot virus*
PSTVd – *Potato spindle tuber viroid*
RSV – *Rice stripe virus*
RTBV – *Rice tungro bacilliform virus*
SCBGAV – *Sugarcane Bacilliform Guadeloupe A Virus*
SCMV – *Sugarcane mosaic virus*
SMV – *Soybean mosaic virus*
TLCBV – *Tomato leaf curl burewala virus*
TLCDV – *Tomato leaf curl Delhi virus*
TMV – *Tobacco mosaic virus*
TNV – *Tobacco necrosis virus*
TYLCV – *Tomato yellow leaf curl virus*
SBMV – *Southern bean mosaic virus*

SHMV – *Sunn-hemp mosaic virus*

SPMV – *Satellite panicum mosaic virus*,

WMV – *Watermelon mosaic virus*

WSMV – *Wheat streak mosaic virus*

ZYMV – *Zucchini yellow mosaic virus*

TGS – Transcriptional Gene Silencing

PTGS – Post Transcriptional Gene Silencing

SCSMV – *Sugarcane's streak mosaic virus*,

АОА – антиоксидантна активність

ПЛР – полімеразно ланцюгова реакція

ЗТ-ПЛР – зворотною транскрипційна полімеразноланцюгова реакція

ПОЛ – перекисне окислення ліпідів

МД – малоновий диальдигід

ДК – дієновий кон'югат

ВА – 6-Benzylaminopurine

НАА – 1-Naphthaleneacetic acid

ПТП – перевивні тестикули поросят

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Необхідність даного дослідження полягає в тому, що на сьогоднішній день не розроблено єдиного ефективного методу боротьби проти вірусних хвороб рослин. Постійна еволюція та адаптація вірусів до захисних механізмів рослин спонукає дослідників шукати нові підходи для мінімізації негативних наслідків, пов'язаних з розвитком вірусів рослин, в тому числі і застосовуючи методи генетичної інженерії.

Актуальність теми. Використання методів генетичної інженерії дало можливість цілеспрямованого створення рослин з новими властивостями. В основі методу генетичної трансформації рослин покладено перенесення та вбудовування цільових генів в рослинний геном [109]. За останні 30 років було створено низку трансгенних рослин, що належать до різних видів і родів [109]. Дослідження в галузі генетичної інженерії умовно можна поділити на прикладні – конструювання трансгенних рослин та фундаментальні, які пов'язані із дослідженням функціонування перенесених генів та їх вплив на рослини.

Основною метою прикладних досліджень є створення рослин, стійких дії стресових факторів, як біотичного так і абіотичного характеру [138]. Методи генетичної інженерії дозволяють зменшувати шкідливу для рослин дію негативних факторів навколишнього середовища. Основними напрямками нових розробок є підвищення стійкості до грибкових, бактеріальних [36], вірусних інфекцій [92], комах [150] гербіцидів [35] та створення рослин–продуцентів рекомбінантних білків та біологічно активних речовин [39].

Важливою проблемою в рослинних агробіоценозах залишається поширеність фітовірусних інфекцій. Для її вирішення створюють рослини

з підвищеною стійкістю до вірусів. При конструюванні таких рослин в їх геном переносять переважно гени вірусів (капсидного білка, транспортного білка, гени-блокатори транскрипції) [66]. Можливе також успішне використання конструкцій, що містять одночасно декілька генів. Наприклад, у векторі на основі гена нуклеокапсиду були закодовані інвертовані повтори вірусу срібної крапчастості кавуну, кільцевої плямистості арахісу, хлоротичної плямистості томатів, плямистого зів'янення томатів. Ця конструкція забезпечує широкий спектр стійкості проти тосповірусів у трансгенних рослин [101]. У відповідь на вірусну інфекцію рослини синтезують спеціалізовані захисні білки, які називаються PR-білки [2], які здатні неспецифічно індукувати «імууну відповідь» в рослинах. Використання векторів в яких закодовані PR-білки є одним з напрямків створення вірусостійких рослин.

Одним з шляхів підвищення стійкості рослин до вірусів є застосування векторних конструкцій, що містять ген, який кодує екстраклітинну РНКазу. [139]. У рослинах РНКазу виконують роль «рослинних Т-кіллерів» завдяки своїй здатності попереджувати реплікацію вірусу [122].

До фундаментальних наукових досліджень в галузі генетичної інженерії можна віднести дослідження впливу перенесених генів на рослинні клітини та їх можливий вплив на рослину.

Наразі методи генетичної інженерії дозволяють переносити гени, однак їх вплив на фізіологічні та біохімічні процеси в клітинах рослин часто залишається до кінця не з'ясованими. Поряд з цим в сучасній науковій літературі широко обговорюють питання стосовно відмінностей у метаболізмі між трансгенними рослинами та рослинами дикого типу. При цьому відсутня інформація щодо того, які саме зміни відбуваються у

трансгенних рослинах та яким чином наявність перенесеного гена та його продуктів впливає на клітини.

Нез'ясованими залишаються питання, пов'язані з реакцією трансгенних рослин на віруси, які пошкоджують клітини рослин, спричиняють зміну метаболічних процесів.

Актуальність представленої роботи полягає у встановленні ефективності використання генів різного походження для створення вірусостійких рослин родини Solanaceae. В роботі використано конструкції з генами екстраклітинних РНКаз бика (*bov*) та цинії (*ZRNase II*) та інтерферону людини (*inf- α 2b*) для створення трансгенних рослин, які теоретично можуть бути стійкими до вірусів. Показано та проаналізовано відмінності перебігу інфекційного процесу у трансгенних рослинах, які експресують перенесені гени. Проаналізовано ефективність використання різних підходів до створення стійких до вірусів рослин.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Роботу проводили в межах тематику відділу генетичної інженерії III-1-15 "Вивчення фізіолого-біохімічних і молекулярно-біологічних особливостей функціонування та успадкування гетерологічних генів в рослинних системах"

Мета та завдання дослідження. Вивчення вірусостійкості трансгенних рослин родини Solanaceae з гетерогічними перенесеними генами до РНК вмісних вірусів рослин.

Для досягнення цієї мети необхідно було розв'язати наступні **завдання:**

1. отримати трансгенні рослини *Nicotiana tabacum* з геном *inf- α 2b*, підтвердити перенесення гетерологічного гена, визначити активність білкового продукту.

2. провести аналіз морфологічних характеристик клітин трансгенних рослин *N. tabacum* та визначити вплив перенесення гена на біохімічні параметри та стійкість до Tobacco mosaic virus (TMV);

3. визначити особливості стійкості до Potato virus Y (PVY) трансгенних рослин *Solanum tuberosum* з генами гетерологічних РНКаз (загальна РНКазна активність, накопичення вірусів в трансгенних та контрольних рослинах);

4. визначити особливості стійкості до TMV трансгенних рослин *Petunia×hybrida* з геном *ZRNase II* (загальна РНКазна активність, АОА, накопичення вірусів в трансгенних та контрольних рослинах);

5. здійснити генетичну трансформацію рослин *Nicotiana benthamiana* вектором з геном гетерологічної РНКазиди *ZRNase II* та створити модельну систему вірус-рослина. Дослідити особливості системного поширення вірусних часток в модельній системі вірус-трансгенна рослина та визначити вплив трансформації на модельну систему.

Об'єкт дослідження — вірусостійкість трансгенних рослин родини Solanaceae до РНК вірусів рослин.

Предмет дослідження — вплив гетерологічних генів на стійкість рослин до вірусів рослин з РНК геномом.

Методи дослідження.

1. метод генетичної трансформації (був використаний для отримання трансгенних рослин *N. tabacum* та *N. benthamiana*).

2. метод Кербера (для визначення інтерферон-подібної активності)

3. методи полімеразної ланцюгової реакції та зворотно транскрипційної полімеразної реакції (були використані для підтвердження перенесення генів);

4. метод електронної мікроскопії (для визначення змін в ультраструктурі клітин трансгенних рослин *N. tabacum* з геном *inf- α 2b*).
5. метод імуноферментного аналізу (був застосований для визначення вмісту вірусних антигенів в рослинах).
6. методи колориметричного визначення РНКазної активності в рослинах;
7. методи визначення вмісту залишкового малонового діальдегіду (для визначення перекисного окислення ліпідів та антиоксидантної активності);
8. метод інфрачервоної спектроскопії (використовували для аналізу трансформованих рослин *N. benthamiana*);
9. опосередкований GFP метод визначення системного поширення вірусних часток в модельній системі вірус-трансгенна рослина (використовували для визначення специфіки розповсюдження вірусу в організмі трансгенних рослин *N. benthamiana*)

Наукова новизна. Вперше застосовано комплексний аналітично-порівняльний підхід визначення ефективності використання різних генів для створення вірусостійких рослин родини Solanaceae до вірусів рослин з РНК геномом. Досліджено використання двох різних підходів на основі генів інтерферону, рибонуклеаз (тваринного та рослинного походження) для підвищення вірусостійкості рослин родини Solanaceae. Проаналізовано ефективність використання різних генів для підвищення стійкості рослин родини Solanaceae до РНК вірусів рослин та показано відмінності у запропонованих підходах. Показано, що використання гена рибонуклеази рослинного походження дозволяє отримувати трансгенні рослини родини Solanaceae з вираженою вірусостійкістю до РНК вірусів рослин. Розроблено нові біотехнологічні підходи для створення рослин родини Solanaceae, стійких до фітовірусних інфекцій

Практичне значення одержаних результатів. Запропонований методичний підхід може бути застосований для розроблення нових сортів вірусостійких рослин родини Solanaceae у спеціалізованих селекційних лабораторіях. На основі представлених даних можуть бути розроблені науково-дослідні та науково-практичні програми для дослідження стійкості рослин до РНКвмісних вірусів. Отримані дані щодо взаємодії між вірусом і трансформованими рослинами можуть бути використані при викладанні спецкурсів з біотехнології, клітинної біології, вірусології, цитології.

Біоетична експертиза. Представлена робота не порушує норми біоетики.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням Потрохова А.О. Наведені в рукописі результати отримано здобувачем особисто або за безпосередньої участі при виконанні експериментів.

Автором особисто були отримані трансгенні рослини *Nicotiana bentamiana* L з гетерологічним геном *ZRNase II* з цинії *Zinnia elegance* та *Nicotiana tabacum* L з геном *inf-2ab* людини. Проведено інфікування рослин, вірусологічні дослідження та біохімічний аналіз вмісту продуктів ПОЛ, АОА, визначено накопичення вірусних антитіл методом ІФА в експериментальних рослинах. Автор особисто провів дослідження визначення загальної РНКазної активності в рослинах родини Solanaceae з генами екстраклітинних рибонуклеаз та імуноферментний аналіз.

Молекулярно-біологічні дослідження проведені спільно з співробітником ІКБГІ пров. інженером Ярошко О. М. Імуннофероментний аналіз визначення вірусів в трансгенних рослинах був проведений спільно к.б.н., с.н.с. Шавченко Т. П. (ННЦ Інститут біології і медицини Національного університету ім. Тараса Шевченка).

Електроно-мікроскопічні дослідження проведені спільно з керівником лабораторії електронної мікроскопії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного к.б.н. Климчуком Д.О.

Дослідження антивірусної активності інтерферону з трансгенних рослин були проведені спільно к.б.н., с.н.с. Трохименко О. П. (ЦНДЛ кафедри вірусології, Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика).

Здобувач самостійно проаналізував та узагальнив літературні та експериментальні дані, сформулював основні положення роботи та висновки, написав текст рукопису дисертації. Аналіз і обговорення отриманих результатів дослідження був проведений спільно з науковим керівником д.б.н. Матвєєвою Н. А. Особисто та у співавторстві підготував до друку наукові праці, в яких викладено основні положення дисертації.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної праці було оприлюднено на міжнародних наукових, науково-практичних конференціях та з'їздах: *“Bioresource and viruses”* September 9-11 2019, Kiev, Ukraine; *БИОТЕХНОЛОГИЯ XXI СТОЛІТТЯ* Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття», присвяченої 135-річчю від дня народження Олександра Володимировича Палладіна (для студентів, аспірантів і молодих вчених) 20 травня 2020 року; *International Scientific Conference Innovation in Science: Global Trends and Regional Aspect: Conference Proceedings*, March 12-13, 2021. Riga, Latvia; Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія XXI століття», присвячена 20-річчю Факультету біотехнології і біотехніки КПІ ім. Ігоря Сікорського; *SEAB 2021*, July 01-03, 2021 Kazakhstan; *Mendel Genetics Conference. A tribute to Gregor Johann Mendel on the bicentennial of his birth*. July 20—23, 2022, Brno (Czech

Republic), *Bioresources and Viruses*“ September 11-13, 2023, Kyiv, Ukraine; Біоресурси і віруси 10-13.09, 2013 Київ; Друга конференція молодих учених Біологія рослин та біотехнологія. ІХБГ 23-24.12- 2013 Київ; ІХ Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія ХХІ століття» 24 квітня 2015 Київ; Біотехнологія: звершення та надії: збірник тез ІV Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених 21-22 травня 2015 р., Київ. – К.: ВЦ НУБіП України, 2015.

Публікації. Результати дисертаційної роботи висвітлені у 19 наукових працях. У тому числі статті у фахових українських виданнях (2 статті в журналах категорії А, які включені до наукометричної бази Scopus та 2 статті категорії Б), а також 3 статті видані в іноземних журналах, 2 з яких включені до наукометричної бази Scopus та 12 тез доповідей із з'їздів та конференцій на яких робота пройшла апробацію.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень та їх обговорення, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаної літератури. Основна частина дисертаційної роботи викладена на 152 сторінки друкованого тексту, містить 40 рисунків, 10 таблиць. Список використаної літератури налічує 167 джерел. Загальний обсяг дисертації складає 184 сторінки.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Основні механізми взаємодії вірус-рослина та способи створення вірусостійких рослин

1.1.1. Взаємодія вірус-рослина

У природних умовах рослини можуть виявляти стійкість до фітопатогенів, зокрема і вірусів [89]. Існує декілька основних реакцій рослини на вірусну інфекцію [71]. Серед них виділяють: незалежну від рослини-господаря стійкість першого типу – цілковиту резистентність, або імунність, яка полягає в природних властивостях не уражуватися певними вірусами і обумовлена власне генотипом рослин. Часто вона запобігає потраплянню патогена у клітину та пов'язана з анатомічною будовою органів рослини: наявні потовщені кутикула або клітинна стінка, густе опушення, біосинтез захисних вторинних метаболітів, тощо. Рослини з таким типом стійкості не мають ознак вірусного ураження. Це резистентність широкого спектру захисту, що забезпечує захист проти всіх штамів патогена, який є інфекційним для інших видів рослин [147, 151].

Оскільки вірусам рослин необхідно подолати фізичний бар'єр клітинної стінки, вони проникають у клітини хазяїна або шляхом механічної інокуляції, або інфекція опосередковується векторами, такими як комахи, нематоди або навіть гриби. Пряме розпізнавання вірусів, ймовірно, не відбувається в апопласті, а на цитоплазматичних мембранах. За умови, що вірус здатний подолати первинні механічні бар'єри, відбувається його розпізнавання через специфічні структури або білки, які асоціюються з патогеном, де збудник розпізнається через білки, які асоціюються з патогеном. Цей тип стійкості веде до виникнення некрозів у місці інфікування, які запобігають подальшому системному поширенню вірусу по рослині. Розпізнавання патоген-асоційованих молекулярних структур (Pathogen Associated Molecular Patterns – PAMPs) відбувається за

допомогою рецепторів розпізнавання (Pattern Recognition Receptors - PRRs) на плазматичних мембранах рослин. Ці PRR розпізнають консервативні структури патогенів та індукують так звану реакцію імунітету, що пов'язана з патогеном. Крім того, є повідомлення про можливу участь внутрішньоклітинних рецептороподібних кіназ (Receptor Like Kinases – RLK), подібних до тих, які беруть участь у розпізнаванні PAMP за допомогою PRR, у взаємодії рослин і вірусів [114].

Остаточні механізми процесів, які викликають резистентність у рослин, ще не з'ясовані. Однак, в рослинах визначено так звані R гени, які вмикають системи захисту рослин та реагують на потрапляння патогенів в рослину [2]. Така система отримала назву вродженої «імунової системи» [8]. Ймовірно, вона виникла внаслідок коеволуції патоген-рослина. У процесі запуску імунової сигнальної мережі рослин відбувається інтенсивний обмін сигналами та розпізнавання [33]. Механізми стійкості до вірусів можуть бути пов'язані з білками, які розташовані як на зовнішніх мембранах, так і всередині клітини. Розпізнавання патогена переважно опосередковане класом рецепторних білків, які містять нуклеотидзв'язувальні (Nucleotide-Binding domain – NB) домени та багаті лейцином повтори (Leucine Rich Repeats – LRR). Ці рецепторні білки розпізнають власне патоген-асоційовані патерни (PAMP) або молекулярні структури асоційовані з пошкодженнями, викликаними патогеном (Damage Associated Molecular Patterns – DAMP). Є також внутрішньоклітинні, так звані NLR (Nucleotide-Binding Domain and Leucine-Rich Repeat) рецептори, які як і попередні мають NB та LRR ділянки. NLR рецептори розпізнають специфічні фактори авірулентності (Avr), що обумовлені патогенами. Відповідно до будови N-кінцевого домену NLR поділяють на два основні класи: TIR (Toll/interleukin-1 рецептор) та CC (Coiled Coil спіральна спіраль домен) [87]. Існує думка, що активна фракція цих протеїнів може

знаходиться в клітинному ядрі [34]. Саме NLR рецептори вважають молекулярними перемикачами, які запускають сигнал захисній системі рослини після виявлення патогена [140]. Активація NLR запускає так званий процес гіперчутливості (Hypersensitive Response – HR), що проявляється у вигляді локальної загибелі клітин, некрозів [11]. Реакція HR, що ініціюється взаємодією білків Avr/R призводить до метаболічних змін рівнів захисних регуляторів росту рослин. Підвищуються вміст саліцилової кислоти (SA), жасмонової кислоти (JA) і оксиду азоту (NO), накопичуються активні форми кисню (АФК), такі як O_2^- і перекис водню, як в інфікованих, так і в неінфікованих тканинах, що і призводить до формування некрозів [80].

Селекційні програми, які направлені на створення вірусостійких рослин спрямовані переважно на отриманні стійких сортів за рахунок схрещування з рослинами природними донорами стійкості. R-ген опосередкована стійкість є видоспецифічною та індукується, коли штам-специфічний ефектор авірулентності (Avr) від патогена поєднується прямо або опосередковано зі спорідненим рослинним білком R [164, 80]. R-білки, що забезпечують захист від бактерій, грибів, оомицетів, нематод, комах і вірусів, були ідентифіковані в різних видах рослин. Неповний перелік виявлених рослинних генів, що обумовлюють резистентність до вірусів, наведено у таблиці 1. Більшість відомих R-білків належать до класу спіральна спіраль (CC) - сайт зв'язування нуклеотидів (NBS) - багаті лейцином повтори (LRR), або до класу рецепторів Toll Interleukin 1 (TIR)-NBS-LRR. Перший ген резистентності N, що був ідентифікований у тютюнів, належить до генів класу гомологічного рецептора Toll Interleukin 1 (TIR)-NBS-LRR. Цей ген надає стійкість до широкого кола тобамовірусів [82]. Переважно гени резистентності впливають на процеси транскрипції вірусів, наприклад, ген eIF4E, який є фактором ініціації транскрипції, бере

участь в механізмах противірусного захисту рослин та пов'язаний із впливом на утворення VPg (вірусного геномзв'язаного білка) [102], а доміантний ген *Rx1* блокує транскрипцію на рівні елонгації [111]. Більшість R-генів кодують внутрішньоклітинні імунні рецептори NLR-типу. Ці рецептори потребують допоміжних NLR для активації імунної сигналізації при сприйнятті патогена – NRC. Багато R генів у родині Solanaceae, включаючи NLR є температуролабільними. Стійкість, обумовлена ціми генами, в багатьох випадках чутлива до температури та знижується при перевищенні +28°C. Проте виявили, що стійкість до PVX, обумовлена *Rx1*, зберігалася при підвищених температурах (до +34°C) у рослинах картоплі та *Nicotiana benthamiana*, які стабільно експресували *Rx1*. Те, що *Rx1*-імунний сигнальний шлях не залежав від температури, означає, що принаймні один допоміжний NRC у *N. benthamiana* є стійким до температури. Автори припустили, що температурна чутливість функціонування генів резистентності пасльонових, ймовірно, пов'язана з сенсором NLR [111]. Іноді для функціонування стійкості потрібно, щонайменше 5 різних протеїнів, як у випадку RTM стійкості у *Arabidopsis thaliana* [28, 60].

R гени стійкості є потенційними кандидатами при створенні генетичних конструкцій, придатних для отримання стійких до вірусів рослин. Гени резистентності бувають доміантними (більшість) та рецесивними. Імунітет, обумовлений рецесивними генами, має в своїй основі несумісність компонентів господаря та вірусу або факторів, які повинні взаємодіяти один з одним для розмноження вірусу в клітинах господаря та індукування інфекції в рослині [59]. Для створення генетичних конструкцій, що надають рослинам стійкість до вірусів, використовують доміантні гени резистентності. Рецесивні гени стійкості можуть

становити інтерес як модель для генетичного редагування. Гени стійкості представлені в таблиці 1.1.

Таблиця 1.1. Рослинні гени стійкості до фітопатогенів.

| Ген стійкості | Рослина | Віруси | Посилання |
|----------------------------------|--|-----------|-----------|
| <i>RCY1</i> | <i>Arabidopsis thaliana</i> | CMV | 129 |
| <i>RTM1</i> | <i>Arabidopsis thaliana</i> | TEV | 28 |
| <i>RTM2</i> | <i>Arabidopsis thaliana</i> | TEV | 28 |
| <i>HRT</i> | <i>Arabidopsis thaliana</i> | TCV | 164 |
| <i>pot-1</i> | <i>Capsicum annuum</i> | PVY, TEV | 100 |
| <i>pvr2</i> | <i>C. annuum</i> | PVY | 117 |
| Ортолог гена пшениці <i>Sbm2</i> | <i>Hordeum vulgare</i> | SBWMV | 95 |
| <i>N</i> | <i>Nicotiana tabacum</i> | TMV | 53, 82 |
| <i>RT4-4</i> | <i>Phaseolus vulgaris</i> | CMV | 130 |
| <i>cyv1</i> | <i>Pisum sativum</i> | CIYVV | 141 |
| <i>pot-1</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> перенесено з <i>L. hirsutum</i> | PVY, TEV | 100 |
| <i>Tm-2²</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> перенесено з <i>S. peruvianum</i> | ToMV, TMV | 68 |

| | | | |
|-------------------------|--|----------------------|-----|
| <i>Tm-1</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> перенесена з <i>S.</i> <i>habrochaites</i> | TMV, ToMV, ToBRFV | 57 |
| <i>SW-5b</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | TSWV, TCSV | 163 |
| <i>elF4E</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | PVY | 116 |
| <i>Rx1</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | PVX | 131 |
| <i>Rx2</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | PVX | 131 |
| <i>Ry_{sto}</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | PVY | 45 |
| <i>CMD2</i> | <i>Manihot esculenta</i> | CBSV, CasMV | 132 |

Примітка. Назви вірусів подано у переліку скорочень.

Встановлено, що у відповідь на вірусну інфекцію рослини синтезують різноманітні противірусні білки такі як: РНК-зв'язуючі білки (RNA binding proteins - RBPs), інактивуючі рибосоми білки (Ribosome inactivating proteins - RIPs), PR-білки (Pathogenesis Related), які можуть функціонувати як супресори вірусів, ферментні білки – РНКазы [90]. Доведено, що у відповідь на вірус PR-білки здатні накопичуватися в незаражених органах, тим самим блокуючи його подальше поширення, а ферментативно активні білки РНКазы можуть виконувати функції «кіллерних» білків, попереджуючи реплікацію геномної РНК [79].

В проведених дослідженнях було виявлено різні типи PR білків та встановлено їх функції. Так, білки PR2а та PR3 з *Nicotiana tabacum* переважно мають протигрибкову активність, але було помічено, що вони також можуть проявляти захисну активність проти вірусу тютюнової мозаїки (TMV) [136]. Крім того, встановлено, що виділений з *Capsicum annuum* білок PR10 (CaPR-10) виявляє рибонуклеолітичну активність щодо TMV. Виявили, що фосфорилування деяких PR білків, зокрема PR10, може посилювати їх противірусну активність [99, 4].

Досліджуючи властивості PR-білків можна не лише розробляти ґрунтовні селективні програми, а й використовувати їх для створення трансгенних рослин, адже PR-білки є можливими генами-кандидатами для отримання вірусостійких трансгенних культур [115, 118].

На сьогодні, використання різноманітних методів біоінформатики таких як: вирівнювання множинних послідовностей, пошук у BLAST, філогенетичний аналіз та дослідження доменів і послідовностей ДНК, відіграє важливу роль у виявленні нових генів, асоційованих зі стійкістю до патогенів, та передбаченні їх можливого впливу на рослинний організм [64].

Певний час лише відбір природньо стійких рослин був оптимальним напрямком захисту від фітовірусів [134]. Окрім селекції стійких генотипів рослин, звільнити рослини від вірусів можна використовуючи культуру апікальних меристем *in vitro* [160]. Принцип функціонування якої, як довгий час вважали, полягав у відставанні зони реплікації вірусів від зони росту меристеми [52, 47 3, 151] Також використовують методи штучного оздоровлення рослин, такі як хімеотерапія або термотерапія [142, 160]. Окрім того, багато вірусів нездатні до вертикального перенесення до нащадків рослини-господаря через насіння. Меристематичні та трансгенераційні антивірусні бар'єри досі залишаються не до кінця дослідженими, проте, згідно з сучасними уявленнями вони значною мірою пов'язані з явищем РНК інтерференції. Отже, крім морфологічних бар'єрів, саме РНК-інтерференція (RNAi) відіграє вирішальну роль у запобіганні або дозволі інвазії меристеми або вертикальної передачі вірусів. Спосіб взаємодії вірусу з RNAi в рослинній меристемі, впливає на прояв симптомів, персистенцію, швидкість реплікації та, зрештою, надходження в потомство господаря [18]. Тому ці дослідження також

важливі для розуміння механізмів взаємодії рослина-вірус і побудови захисних стратегій.

1.1.2 Стратегії створення вірусостійких рослин

На сьогодні використання сучасних молекулярно-біологічних та генно-інженерних підходів дозволяє розширити арсенал боротьби з рослинними вірусами [120]. Розглядаючи спеціалізовані направлені зміни в геномі рослин для створення вірусостійких рослин, можна виділити декілька основних стратегій розвитку цього напрямку генетичної інженерії, які представлені в таблиці 2. Початкові спроби створити генетичні конструкції, що надають стійкість до вірусу, базувалися на концепції резистентності, отриманої від патогенів [66], що полягало у використанні генетичних послідовностей пов'язаних з капсидними, транспортними або білками реплікази вірусів. В подальшому виявили, існування різноманітних механізмів, які впливають на РНК вірусів і призводять до замовкання генів, що також є ефективними для створення стійких рослин [128]. Стратегії, які використовують для створення вірусостійких рослин представлені в таблиці 1.2

Таблиця 1.2 Деякі стратегії створення стійких до вірусів рослин з використанням генно-інженерних методів.

| Механізм/стратегія | Родини рослин | Продукти/механізми, що блокують віруси | Віруси | Посилання |
|--------------------------|---|--|---|-------------|
| Поверхневі білки капсиду | Caricaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Orchidaceae, Rosaceae, | Посттранскрипційне замовкання генів; siRNA | CMV, TMV, PVY, CymMV, ORSV, BMV, PLRV, PPV, PRSV, WMV, ZYMV | 106, 74, 97 |

| | | | | |
|----------------------------|--|---|--|----------------|
| | Solanaceae | | | |
| Блокування реплікази | Musaceae, Solanaceae | Дефектні гени реплікази, РНК сайленсинг | BBTV, TYLCV, CMV, TMV | 43, 106, 59 |
| РНК залежна РНК полімераза | Solanaceae | Ген, що кодує вірусну РНК залежну РНК полімеразу, ситрез коротких кРНК та подальша інактивація вірусу шляхом сайленсингу | TMV, джермінівіруси | 154, 49 |
| РНК інтерференція | Brassicaceae, Fabaceae, Solanaceae | Малі інтерферуючі РНК/мікроРНК (siRNA/miRNA), РНК індукований комплекс сайленсингу (RISC), комплементарн е спарювання siRNA/miRNA з цільовим геном, розщеплення | BBrMV, BBTV, BYDV, CasMV, CMV, CMV, CTV, MDV, MSV, MYMIV, PLRV, PNRV, PRSV, PVX, PVY, RTBV, SCMV, SMV, TCSV, TLCDV, TMV, TYLCV, WSMV | 73, 143, 1, 77 |

| | | | | |
|-------------------------------|--|--|--|------------------------------|
| | | вірусного гена білком аргонавт (AGO) | | |
| РНК сателіти | Solanaceae | siRNA, РНК інтерференція | CMV | 133 |
| Гетерологічні рибонуклеази | Asteraceae, Fabaceae, Poaceae, Solanaceae | Внутрішньо- та позаклітинні РНКазы | BCMV, BPMV, BSMV, CMV, CSVd, PSTVd, PVY, RBSDV, SMV, TEV, TSWV, WMV | Детальніше див. Табл. 1.3 |
| Білки інактиватори рибосом | Cannabaceae, Caricaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Solanaceae | Аденін полінуклеотид глюкозилазна активність, інгібування трансляції кепованої РНК | ACMV, AMCV, AMV, BMV, BYMV, ChiVMV, CMV, ICRSV, PLRV, PMV, PRSV, PVX, PVY, SBMV, SHMV, SPMV, TBSV, TEV, TMV, TNV, TuMV, ZYMV. | 24 |
| МікроРНК | Solanaceae, Poaceae, | мікроРНК | BNYVV, BYDV, RSV, SCBGAV | 83 |
| "Антитіла рослин" | Betaceae, Rutaceae, Solanaceae | ScFv- антитіло, фрагменти антитіл ScFv | AMCV, ArMV, BNYV, CMV, CYVV, JMV, PVY, TBSV | 119, 55 |

| | | | |
|-------------|------------|---|--|
| CRISPR-Cas9 | Solanaceae | Транз'єтна експресія sgRNA та Cas9 ендонуклеази, які вносять двуниткові розриви в ДНК вірусів | BCTV, BSCTV, ⁴⁹ BeYDV, MeMV |
|-------------|------------|---|--|

Примітка. Назви вірусів подано у переліку скорочень.

Першою і найбільш поширеною стратегією для отримання вірусостійких трансгенних рослин, є використання феномену, якій отримав назву патоген-обумовленої резистентності (Pathogen Derived Resistance – PDR). В клітини таких рослин переносять заковдані послідовності окремих вірусних білків, або безпосередньо нуклеїнових кислот вірусів [13].

Серед вірусних білків найбільшу увагу зосереджено на репліказах, протеазах, транспортних та капсидних білках. Однак, нині відомо, що розвиток PAR можливий і за рахунок наявності, власне самої вірусної РНК, що дає нові можливості, засновані на РНК-опосередкованій стійкості. Однак, навіть зараз вчені не мають чіткого розуміння всіх молекулярних механізмів утворення стійкості за рахунок PDR [110, 5].

Перші спроби створення вірусостійких трансгенних рослин з використанням феномену PDR, почалися з використання TMV і його капсидного білка [91]. Використання капсидних білків показало свою високу ефективність, проте така стійкість є вузькоспеціалізованою [106]. Було висунуто припущення, що це саме білок-опосередкована стійкість, оскільки трансгенні рослини мали високу стійкість при інокуляції віріонами, але не вірусною РНК. Проте, іноді при застосуванні

послідовностей капсидних білків для генетичної трансформації рослин, отримана резистентність буває обумовленою явищами РНК інтерференції [97].

Окрім білка оболонки часто застосовують інший тип білків – транспортні. Специфічно модифікуючи клітинні плазмодесми, ці білки дозволяють інфекції поширюватися між сусідніми клітинами, а згодом, потрапляючи у провідні системи рослин забезпечують системне поширення вірусів по всьому організму [70, 27]. При створенні трансгенних рослин, які містили мутантні форми транспортних білків вірусів, виявилось, що отримані рослини були більш стійкими до вірусних інфекцій. Такий підхід потенційно дозволяє отримувати трансгенні рослини, які б проявляли стійкість одразу до декількох вірусів, оскільки транспортні білки можуть використовуватися рядом споріднених вірусів [70, 106].

Іншим типом захисту є експресія повних або неповних генів вірусних репліказ, що сприяє розвитку стійкості до інфекції, котра, як правило, обмежується штамом вірусу, ген реплікази якого використовується. Вважають, що репліказа, експресована у рослинах, зв'язується з білками господаря або вірусу, які регулюють реплікацію та експресію генів вірусу [106]. Цікаво, що ця стратегія є ефективною навіть для забезпечення стійкості проти одноланцюгових ДНК-вмісних вірусів, таких як джемівіруси [16, 49].

Іншим способом створення стійких рослин є використання явища РНК інтерференції. Розрізання двохланцюгових РНК вірусів (double stranded RNAs – dsRNAs) на короткі інтерферуючі РНК (short interfering RNAs – siRNAs) або мікро РНК (micro RNAs – miRNAs) [1] ініціює в організмі рослини процес мовчання генів та унеможливорює подальший розвиток вірусної інфекції. Це відбувається за рахунок розпізнавання

рослинами дволанцюгових ділянок РНК, внаслідок чого відбувається їх руйнування рослинними комплексами Dicer та Risc, які активують РНКазу, руйнуючи вірусні РНК. При трансформації рослини фрагментом ДНК у вигляді інвертованих повторів або комплементарним РНК вірусу відбувається активація захисних систем, які руйнують РНК вірусу [158]. Цікаво, що параретро- та ДНК-віруси рослин, такі як каулімовіруси та джемівіруси, також є мішенями сайленсингу [113]. Припускають, що механізм мовчання генів є надзвичайно поширеним природним захисним механізмом рослин, що може бути активно використаний в генетичній інженерії.

Використання антизмістової РНК, мікроРНК та косупресії дозволяє спонукати розвиток мовчання генів. Завдяки явищу мовчання генів стало можливим створення мультистійких рослин [156, 159]. У противірусному імунітеті, опосередкованому сайленсингом РНК, є два основних механізми захисту рослин від вторгнення вірусних нуклеїнових кислот: транскрипційне мовчання генів (Transcriptional Gene Silencing – TGS) та посттранскрипційне мовчання генів (Post Transcriptional Gene Silencing – PTGS). TGS діє на ДНК-вмісні віруси, пригнічує транскрипцію цільових локусів, контролюючи статус метилювання хроматину та утворення гетерохроматину. PTGS спрацьовує як захисний механізм проти РНК- і ДНК-вмісних вірусів та діє на посттранскрипційному рівні, спрямовуючи мішені мРНК до деградації або пригнічення трансляції. Деякі віруси з широким колом господарів мають різні стратегії пригнічення противірусного захисту, обумовленого РНК-сайленсингом господаря. Вірусні супресори сайленсингу можуть перешкоджати або зменшувати ефективність PTGS та TGS. Вони також можуть впливати шляхом активації або індукції експресії ендогенних супресорів. Імуносупресорна діяльність деяких вірусів може пояснити їх широкий спектр хазяїв і

поставити під загрозу успіх стратегій на основі siRNA [143], але, в той же час вона відкриває можливість створення стратегій, направлених проти вірусних супресорів сайленсингу [73, 126, 107, 137, 156]. Саме на вірусні супресори сайленсингу рослин може впливати (пригнічувати) використання сателітних РНК (satRNA) [133]. Проте, Y-Sat (satRNA) вірусу огіркової мозаїки (CMV) можуть відігравати і іншу роль окрім тієї, що послаблюють симптоми вірусної інфекції: деякі з них, додатково навантажуючи AGO1, сприяють розщепленню ендогенної мРНК і самі викликають захворювання [40].

Ще одним підходом створення стійких рослин є використання білків-інактиваторів рибосом [24]. Ці білки блокують рибосомальну одиницю 28S РНК.

Рибозими – це молекули РНК, які мають власну каталітичну активність для високоспецифічного гідролізу нулеїнових послідовностей, яка інгібує експресію генів. Завдяки такому підходу було створено рослини дині стійкі до WMV2 та ZYMV [54].

Цікавим підходом до створення стійких рослин є використання “рослинних антитіл”. Хоча, рослини не мають власної повноцінної імунної системи, однак за допомогою методів генетичної інженерії можливе перенесення генів, що відповідають за синтез антитіл. Показано, що рослини тютюну, в яких синтезувалися антитіла до поверхневого білка вірусу ризоманії буряку, виявилися стійкими при їх інфікуванні шляхом механічного пошкодження та при інфікуванні через природній вектор *Polymyxa betae* [55]. Цікаво, що антитіла в рослинах для нормального функціонування повинні формувати сульфгідрильні містки, які можуть утворюватися в апопласті, або ендоплазматичному ретикулюмі, але не цитоплазмі. Проте, оскільки при транспорті в ендоплазматичний ретикулюм антитіла виявляються відокремленими від вірусів, то

перспективним є їх поєднання з сигналами апопластного транспортування [119]

Окрім вищезазначених підходів існує ще низка альтернативних стратегій забезпечення вірусостійкості у трансгенних рослин. Наприклад, один з таких підходів – це використання генів природної стійкості рослин, що кодуєть вище зазначені PR білки, для генетичної трансформації. Іншим досить перспективним підходом є індукція стійкості шляхом сайленсингу рослинних генів, необхідних для реплікації вірусу.

Альтернативним підходом є використання білків тваринного походження, зокрема інтерферонів. Інтерферон відіграє важливу роль в організмі ссавців. Він виступає у ролі регулятора імунної системи, підвищує активність цитотоксичних Т-лімфоцитів, індукує фагоцитарну активність макрофагів, сприяє лізису інфікованих клітин, уповільнює розвиток вірусних інфекцій на первинних етапах. [31]. Інтерферон індукує 2'-5'- олігоаденілатсинтетазу, яка полімеризує АТР з утворенням 2'-5'- олігоаденілатів, що активують РНКазу L, що в свою чергу гідролізує вірусну РНК. Така система отримала назву 2'-5'- олігоаденілатної або 2-5A. При потраплянні патогена в організм тварини спрацьовує 2-5A система, що складається з двох основних білків 2-5A синтази та 2-5A РНК залежної РНКазу L [31]. На сьогоднішній день було продемонстровано можливість стабільного перенесення гена *inf* в рослини. [62, 20] та доведено його синтез, а також встановлено, що “рослинний інтерферон” виявляє антивірусну активність в культурі клітин ссавців.

Однак, при спробі використати інтерферон для захисту від фітовірусів результати виявились неоднозначними. Так, в дослідженнях Рівкіна було досліджено вплив перенесення гена β -інтерферона в рослини тютюну, в результаті виявилось, що в інфікованих ВТМ рослинах інфекційний процес гальмувався, однак інфекція продовжувала

персистувати [112]. Ймовірно, інтерферон, який синтезується в рослинах не був спроможний повноцінно захищати від фітовірусної інфекції. Продемонстровано, що трансгенні рослини тютюну, в яких було закодовано РНКазу L та 2-5A синтазу, виявилися стійкими до альфа мозаїк вірусу. При інфікуванні рослин вірусом відбувалося уповільнення розвитку вірусної інфекції та її локалізація на первинно інфікованих ділянках [86].

Ще одним із підходів, про який ми поговоримо більш детально, є використання генів гетерологічних рибонуклеаз.

1.1.3 Характеристика рибонуклеаз

РНКазы – це ферменти фосфодіестерази, що гідролізують фосфодієфірний зв'язок у молекулах РНК. Переважно вони локалізовані в органелах або в позаклітинному просторі. РНКазы можуть бути розділені на 3 родини: РНКазы А (хребетні), РНКазы Т1 (бактерії, гриби) і РНКазы Т2 (віруси, бактерії, гриби, рослини, тварини). У більшості організмів є лише один ген такого ферменту, однак у рослин генів може бути декілька. Рослинні РНКазы відносять до родин так званих РНКаз Т2 типу, які часто є секреторними та транспортуються в апопласт, вакуолі, чи депонуються в ендоплазматичному ретикулюмі [46, 79]. Ферменти з цієї родини є ендорибонуклеазами, які неспецифічно розщеплюють РНК за рахунок роботи активного центру ферменту, який містить консервативні залишки гістидину. Їх ферментативний механізм є двоступеневим і включає трансфосфорилування та гідроліз. РНКазы цього типу також можуть зустрічатися у великій кількості бактерій, грибів та навіть деяких вірусів та тварин [65].

Філогенетичний аналіз дозволив розділити РНКазы Т2 типу на три класи [32]:

- I клас – це білки пов'язані з різноманітними відповідями на абіотичний та біотичний стрес. Цей клас характеризується значною мінливістю;
- II клас – це консервативний клас РНКаз виявлений у насінневих рослин. Функції ферментів цього класу пов'язані із реутилізацією РНК;
- III клас – головним чином пов'язаний із самонесумісністю, ферменти цього класу було названо S-РНКазами, тоді як інші рослинні ферменти родини T2 є S-подібними РНКазами.

Встановлено, що вміст рибонуклеаз здатний значно збільшуватися при стресових умовах. Так, виявили відмінність в активності РНКаз та їх динаміці при аналізі двох сортів гречки, які мають різну чутливість до вірусу опіку гречки (BBV): у сорту з середньою чутливістю до вірусу РНКазна активність коливалася з моменту інфікування вірусом, тоді як у толерантного сорту – поступово зростала [135]. Також показано, що у рослин арабідопсису як відповідь на стрес, зокрема спричинений впливом фосфатного голодування, індукується екстраклітинна рибонуклеаза RNS1, яка локалізується не лише в місці поранення, а й в віддалених непошкоджених тканинах [12].

Для досліджень, пов'язаних зі створенням вірусостійких трансгенних рослин, інтерес становлять саме S-подібні РНКазы рослин. Ймовірно, що S-подібні РНКазы у рослин індуються при старінні, оскільки цей процес характеризується деградацією макромолекул, зокрема РНК, і зниженням фотосинтетичної активності. Поранення також є індуктором активації позаклітинних РНКаз, котрі розщеплюють РНК для повторного використання фосфатів навколишніми клітинами. Багато генів позаклітинних S-подібних РНКаз експресуються у квітах. Вони виробляються в маточках і секретуються в позаклітинний матрикс [65]. Незважаючи на той факт, що тканини квітів багаті поживними речовинами, вони майже не ушкоджуються збудниками хвороб. Це узгоджується з

високим рівнем рибонуклеазної активності у квітах, тому було припущено, що така активність пов'язана з захистом квітів від патогенів. Компоненти апопласту відіграють ключову роль на початкових етапах взаємодії рослин та патогенів. Позаклітинні РНКазы можуть потенційно брати участь у протидії вірусам, завдяки позаклітинній локалізації. Ці ферменти мають низький рівень активності в інтактних листках та індуються у відповідь на поранення та проникнення збудника [122].

Точний механізм антивірусного захисту рослин за допомогою РНКаз ще невідомий, однак виділяють три можливих механізми їх впливу на РНК вірусів, які можуть проявлятися на будь-якій стадії інфекції. На першому етапі, коли РНКазы зустрічає вірус поза клітиною, вона може знищити вірусну РНК, хоча сам механізм проникнення РНКазы всередину віріону незрозумілий і потребує подальших досліджень. Проте доведено, що інфекційність вірусу зменшується при безпосередній обробці частинок вірусу РНКазою [10]. На наступному етапі РНКазы може взаємодіяти з вірусом усередині ендосоми, оскільки ендосомний тип інтерналізації характерний для екзогенних РНК [148, 79]. Нарешті, можливим місцем взаємодії є проникнення РНКазы в ядро клітин де ферментативна активність РНКазы може безпосередньо впливати на вірусну РНК і руйнувати її [10, 139, 81].

Дослідження власне внутрішньоядерної локалізації деяких РНКаз триває, проте така локалізація вже була переконливо продемонстрована для бичачої РНКазы. Окрім того, пильна увага дослідників зосереджена на можливості втручання екзогенних РНКаз в процес РНК-інтерференції, що бере участь у захисті проти вірусів. Механізм противірусної активності РНКаз включає як прямий вплив на нуклеокапсид та нуклеїнову кислоту, так непрямий вплив, тобто втручання в РНК-інтерференцію, індукція апоптозу заражених клітин.

1.1.4. Використання рибонуклеаз для створення трансгенних вірусостійких рослин

В міру того, як розширювалось уявлення про роль РНКаз у захисті рослин від вірусних інфекцій, було започатковано новий напрямок створення стійких трансгенних рослин. Було розпочато дослідження зі створення трансгенних ліній рослин з гетерологічними генами РНКаз, клонованими з організмів різного філогенетичного походження (табл. 1.3).

Таблиця 1.3. Перелік гетерологічних РНКаз, використаних для створення трансгенних рослин, стійких до широкого спектру вірусів

| Гени, що кодують РНКаз | Джерело гена | Трансгенні рослини, в яких еспресовано ген | Віруси, якими інфікували рослини | Посилання |
|------------------------------|----------------------------------|--|----------------------------------|-----------|
| <i>Rnc</i> , <i>rnc70</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>Nicotiana tabacum</i> , | TEV, TMV | 69 |
| | | <i>Triticum aestivum</i> | BSMV | 161 |
| | | <i>Zea mays</i> | RBSDV | 21 |
| <i>RncIII</i> | <i>Serratia marcescens</i> | <i>Nicotiana tabacum</i> | TMV | 162 |
| <i>pac1</i> | <i>Schizosaccharomyces pombe</i> | <i>Nicotiana tabacum</i> | CMV, PVY | 153 |
| | | <i>Solanum tuberosum</i> | PSTVd | 124 |
| | | | | 94 |
| <i>Impatiens walleriana</i> | | | TSWV | 85 |

| | | | | |
|------------------|-----------------------|----------------------------------|----------------------------|-----|
| | | <i>Dendranthema grandiflora,</i> | CSVd, TSWV | 93 |
| | | <i>Glicine mas</i> | BCMV, BPMV, SMV, WMV | 155 |
| | | <i>Saccharum officinarum</i> | SCSMV | 152 |
| <i>bov</i> | <i>Bos taurus</i> | <i>Nicotiana tabacum</i> | TMV | 145 |
| | | | CMV | 139 |
| | | <i>Solanum tuberosum</i> | PVY | 104 |
| <i>ZRNase II</i> | <i>Zinnia elegans</i> | <i>Nicotiana tabacum,</i> | TMV | 145 |
| | | <i>Solanum tuberosum</i> | PVY | 104 |
| | | <i>Petunia</i> × <i>hybrida</i> | TMV | 96 |

Примітка. Назви вірусів подано у переліку скорочень.

Вперше гени гетерологічної РНКазы були перенесені в геном *Nicotiana tabacum*. Було описано отримання трансгенних рослин тютюну, що експресують ген *rnc* бактеріального походження, що кодує ендорибонуклеазу РНКазу III, та мутантний ген *rnc70*, що кодує мутантну форму ферменту [69]. РНКазы III дикого типу спричиняла незначну затримку росту в деяких рослинних лініях, але, незважаючи на це, трансгенні рослини як з білком дикого типу, так і мутантним, були стійкими до зараження РНК-вмісними вірусами із мультипартитним геномом, але не проти вірусів з одноланцюговим РНК-геномом [69].

Використання гена *rnc70* дозволило також отримати трансгенну пшеницю, яка виявилася високостійкою до вірусу BSMV. У цих новостворених трансгенних рослинах були відсутні симптоми вірусної інфекції, а результати проведеного Вестерн-блотингу показали нижчий рівень акумуляції віріонів [161]. Більше того, подальші дослідження вказують на можливість використання такого типу підходу до захисту рослин протягом декількох рослинних поколінь. Було встановлено, що ген *rnc70* в трансгенних лініях кукурудзи, вирощених в польових умовах конститутивно експресувався впродовж 12 поколінь. Виявилось, що після інфікування отриманих ліній вірусом RBSDV (збудником хвороби чорно-смугастої карликовості рису) розвиток симптомів був послаблений у порівнянні з рослинами дикого типу. Повторний молекулярно-біологічний аналіз на предмет присутності гена *rnc70* довів, що трансген був стабільно інтегрований в геном і ефективно експресувався [21].

Іншим прикладом використання бактеріальних нуклеаз, є використання високоактивних нуклеаз, отриманих з бактерій *Serratia marcescens*. Ці нуклеази неспецифічно розщеплюють як РНК, та, навіть, деякі ДНК [162]. При генетичній трансформації тютюну виявили, що РНКазы III з *S. marcescens* є токсичною для рослинних тканин при конститутивній експресії гена *RncIII*. Використання індукцибельного промотору гена аніонної пероксидази із *Solanum lycopersicum* (*Tap1*) дозволило отримати трансгенні рослини тютюну. Активність цього промотора індукується пораненням. Проте, після інфікування TMV не спостерігали зменшення накопичення антигенів капсидного протеїна вірусу у трансформантів порівняно з рослинами дикого типу. В той же час рівень експресії РНКаз у трансгенних рослинах через 84 години після поранення перевищував аналогічний показник у контрольних в 5-7 разів. Можна припустити, що експресія РНКазы III відбувалася занадто повільно

і вірус встигав інфікувати клітину до моменту, коли ефективна робота РНКаз могла б перешкодити цьому.

Крім бактеріальних генів рибонуклеаз для створення стійких до вірусів трансгенних рослин використовували гени, клоновані з дріжджів. Ген дволанцюгової РНК-специфічної РНКазиди *pac1* з *Schizosaccharomyces pombe* [75] був випробуваний як потенційний індуктор множинної резистентності до вірусів, оскільки як одноланцюгові, так і дволанцюгові РНК-віруси генерують реплікативну форму дволанцюгової РНК під час проходження циклу реплікації. Дволанцюгова РНК-специфічна рибонуклеаза (PAC1), кодована геном *Pac1*, може розпізнавати та деградувати дволанцюгову РНК. У трансгенних рослин з цим геном підтверджено мультівірусну стійкість. Було показано, що трансгенний тютюн був стійкий до CMV та PVY [153]. Рослини картоплі, в геном яких перенесли *pac1*, інгібували розвиток інфекції та накопичення віроїду при інокуляції віроїдом PSTVd [94]. Також були отримані трансгенні рослини хризантеми (*Dendranthema grandiflora*) з геном *pac1*. Після інокуляції віроїдом карликовості хризантем, ці лінії виявилися стійкішими, ніж контрольні рослини, окрім того вони також виявилися менш чутливими до TSWV [93]. Трансгенна соя, що надекспресує ген РНКазиди *pac1*, продемонструвала підвищену стійкість до множинних вірусів [155]. З цим геном було також отримано трансгенні рослини цукрової тростини (*Saccharum officinarum*). Експресія PAC1 у трансгенній цукровій тростині була успішно продемонстрована та привела до створення вірусостійкої цукрової тростини. Трансгенні рослини заражали шляхом інокуляції SCSMV. Результати показали, що хоча всі трансгенні лінії були заражені SCSMV, мозаїчні симптоми, які з'явилися на листках, були значно м'якшими, ніж у дикого типу. Усі інфіковані трансгенні пагони переважали

пагони дикого типу за інтенсивністю росту та показали значно нижче накопичення вірусних часток [152].

В дослідженнях використовували не лише гени клоновані з бактерій або дріжджів. Вивчали противірусний вплив тваринних рибонуклеаз при їх експресії у рослинах, зокрема, ген *bov*, що кодує рибонуклеазу А. Це РНКаза підшлункової залози з *Bos taurus*, що розщеплює одноланцюгову РНК лише після дозрівання (видалення N-кінцевого лідерного пептиду під час секреції), тоді як незріла форма білка неактивна, і вона здійснює свою дію в лужному середовищі [108]. Її використали для створення трансгенних рослин тютюну (*Nicotiana tabacum* cv. SR1). Рослини, які експресували позаклітинну рибонуклеазу з бичачої підшлункової залози, мали підвищений рівень активності рибонуклеази в екстрактах листя [145]. Отримані рослини інфікували TMV. Трансгенні рослини були значно більш захищеними від вірусної інфекції, ніж контрольні нетрансформовані рослини. Дослідники відзначали відсутність чи значну затримку прояву симптомів вірусної інфекції. Було зроблено припущення, що експресія гена цієї рибонуклеази може бути використана для ефективного захисту від вірусних захворювань рослин [145]. У іншій роботі трансгенний тютюн з геном рибонуклеази бика був перевірений на стійкість до CMV. Через 10 днів після інокуляції вірусом спостерігали сильні симптоми мозаїки у контрольних нетрансгенних рослин, тоді як симптоми захворювання були менш яскраво виражені у трансгенних рослин, що експресували ген РНКаз. Вірогідно, що експресія РНКаз приводила до збільшення неспецифічної резистентності до РНК геномних вірусів [139].

Переваги підходу продемонстровані не лише на прикладі трансгенних рослин модельного виду *Nicotiana tabacum*, що мали підвищену стійкість до рослинних вірусів [122, 139]. Ген рибонуклеази підшлункової залози бика (*bov*) використовували також для створення

вірусостійких рослин картоплі – цінного сільськогосподарського виду. Зовнішній вигляд отриманих трансгенних рослин вигідно відрізнявся від контрольних після інфікування таких рослин PVY. Спостерігали сукупний вплив генотипу і активності РНКаз в рослинах на чутливість до вірусної інфекції. Проте у накопиченні вірусних антигенів не вдалося спостерігати достовірної різниці між трансгенними та контрольними рослинами [104].

РНКаз А тваринного походження транспортується з цитоплазми в апопласт і не має очевидних функцій в рослинній клітині. Експресія цього РНК-гідролізуючого ферменту справляла позитивний вплив на стійкість рослин до вірусів з різних родин. Механізми дії цієї позаклітинної РНКазі можуть полягати в безпосередньому гідролізі вірусної РНК у апопласті, перед проникненням в клітину, при проникненні в цитоплазму разом з вірусом, коли вірусна РНК звільняється від білків оболонки або в знищенні самої клітини шляхом гідролізу мРНК та рРНК, якщо вірус проникає в неї при механічному пошкодженні клітинної стінки. Позаклітинна РНКаз виявилася ефективною для боротьби з вірусами, які поширюються з клітини в клітину через плазмодесми та системно на значну відстань по рослині по флоємі [139].

Розглядаючи варіанти використання генів РНКаз отриманих з різних видів, необхідно зазначити, що цікавим напрямком є використання власне рослинних РНКаз. Рибонуклеазу, ген якої починає експресуватися у відповідь на поранення, було виявлено в *Zinnia elegans* [157]. Ген було клоновано [157, 123] та підтверджено, що експресія гена *ZRNase II* була індукована у відповідь на поранення, оскільки мРНК цієї РНКазі не була виявлена в непоранених органах цинії, а ген *ZRNase II* був індукований лише через 6 годин після поранення. РНКаз цинії є позаклітинною – в клітині відбувається її транспорт у апопласт. Гіпотетичний механізм противірусної дії позаклітинної РНКазі цинії може полягати, подібно до

механізму дії РНКаз А тваринного походження, як в ураженні геномної РНК вірусів на певних етапах їх проникнення в рослинну клітину, так і в моделюванні запрограмованої загибелі клітини. При порушенні цілісності тканин вміст апопласту може проникати в цитоплазму пошкоджених клітин, у цьому випадку активні РНКазі функціонують як білки-«кілери», які вбивають клітину та перешкоджають реплікації геномної РНК вірусу, що проник у неї, та подальшому системному ураженню рослини [122]. Кількість досліджень, присвячених трансгенним рослинам із гетерологічними позаклітинними РНКазами, досить обмежена [63]. Руйнування РНК вірусу РНКазами затримує розвиток симптомів, пом'якшує їх вираженість або локалізує інфекцію [145]. Такий підхід дає можливість отримувати як модельні, так і сільськогосподарські види рослини, стійкі до широкого спектру вірусів [144, 104, 96].

Вперше ген *ZRNase II*, отриманий з *Zinnia elegans*, було використано для отримання трансгенних рослин тютюну з підвищеною рибонуклеазною активністю [123]. Експресія гена *ZRNase II*, підвищувала рибонуклеазну активність трансгенних тютюнів у 10-15 разів в порівнянні з контролем. Після інокуляції вірусом тютюнової мозаїки трансгенні рослини продемонстрували значну затримку появи вірусних симптомів, які залежали від концентрації вірусу в інокулюмі та активності рибонуклеази [144].

У роботі [104] також досліджували вплив експресії гена *ZRNase II* на стійкість до PVY у трансгенній картоплі (*Solanum tuberosum*). Виявили затримку розвитку симптомів інфекції та зменшення накопичення вірусних антигенів. Рівень активності РНКазі у трансгенних рослинах, що експресували ген *ZRNase II*, перевищував активність, виявлену в трансгенних рослинах картоплі з геном *bov*. Проте підвищена активність РНКаз не повністю запобігала розвитку вірусної інфекції у трансгенних

рослинах. Візуальні прояви вірусної інфекції в трансгенній картоплі були легшими, ніж у контрольних рослин, і їх розвиток затримувався, але повної ліквідації вірусу не відбулося. При порівнянні рівня накопичення вірусних антигенів у не трансгенних контрольних рослинах картоплі та трансгенних рослинах з генами *bov* та *ZRNase II*, найнижчий рівень накопичення вірусу мали останні [104].

Рослини петунії трансформовані геном *ZRNase II*, також мали підвищену активність РНКаз порівняно з контролем. Дослідження загальної антиоксидантної активності (АОА) листових екстрактів петунії показало, що після інфікування рослин вірусом тютюнової мозаїки, рівні АОА трансгенних рослин перевищували показники контрольних на 18–30%, що може свідчити про їх підвищені життєздатність в умовах стреса та стійкість до вірусної інфекції [103].

В дослідженнях [144] спостерігали, що, у випадку низького (0,01 мкг/мл) або середнього (0,1 мкг/мл) вмісту вірусних частинок у інокуляті для інфікування рослин тютюну, накопичення вірусу та розвиток симптомів інфекції були відсутні або сповільнені у трансформованих рослинах порівняно з контрольними. Якщо концентрація TMV в інокуляті становила 10 мкг/мл, відмінності між інфікованим контролем і трансформованими рослинами через 3 тижні після інокуляції були менш очевидними. Отже, можна припустити, що існує певна залежність ефективності роботи екстракційних рибонуклеаз від інфікуючої дози. Проте, коли в подальшому для інфікування трансгенної петунії з геном *ZRNase II* було використано дуже високу інфікуючу дозу TMV (250 мкг/мл) для отримання можливої системної інфекції, спостерігали ефективний захист рослин, завдяки присутності та експресії гена *ZRNase II*. Непрямий імуноферментний аналіз показав, що інфіковані рослини, чутливого до цього вірусу сорту, накопчували у 3,3 – 4,0 рази менше

вірусних антигенів порівняно з інфікованими рослинами дикого типу [96]. Відмінності у симптомах вірусного ураження між рослинами дикого типу та трансгенними зберігалися і після 3 тижнів культивування. Ці результати демонструють легший перебіг інфекції у інокульованих трансгенних рослин, що підтверджує результати попередніх робіт [123, 144, 104].

Таким чином, результати аналізу стійкості до вірусів у трансгенних рослин з модифікованим рівнем РНКазної активності в апопласті дозволяють зробити висновок, що ці білки можуть сформувати «нуклеазний» бар'єр для РНК-вірусів і розглянути їх як елементи неспецифічної системи захисту рослин. Підвищена стійкість трансгенних рослин, що експресують гетерологічні РНКазы, демонструє потребу більш детального вивчення ролі аутологічних та гетерологічних рибонуклеаз в захисній системі вищих рослин. На основі отриманих даних можна розробити стратегії отримання нових сортів сільськогосподарських рослин з підвищеним рівнем неспецифічної стійкості до вірусів, зокрема з генами позаклітинних РНКаз.

Таким чином, існує декілька різних підходів для створення вірусостійких рослин, кожен з яких має як свої переваги так і недоліки

1.2 Об'єкти дослідження

Об'єктами дослідження в даній роботі були рослини родини пасльонових (Solanaceae): *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana*, *Solanum tuberosum* L, *Petunia* × *hybrida* hort. ex Vilm.

Рослини роду *Nicotiana* були історично першими на яких почали проводити біотехнологічні дослідження. Ще в 80-ті роки двадцятого сторіччя були створенні перші трансформовані рослини. Для їх створення використовували векторні конструкції на основі *Agrobacterium tumefaciens*. Метою таких досліджень було отримання трансформованих рослин, в геномі яких були б закодовані бактеріальні гени. [41]. Кілька

видів і сортів рослин тютюну сьогодні використовуються як модельні в генетичних і вірусологічних дослідженнях [44]. В нашій роботі рослини тютюну були використанні, оскільки вони є ідеальним модельним об'єктами для генетичних та вірусологічних досліджень.

Petunia × hybrida це декоративна рослина яка має важливе економічне значення і традиційно розмножується насінням. Однак поява сучасних гібридних сортів під назвою «Surfinia» призвела до збільшення вегетативного розмноження, що в свою чергу підвищило ризик отримати заражений посадковий матеріал [23]. Було ідентифіковано 26 РНК-вмісних вірусів та 4 віроїди, які можуть уражувати рослини петунії [125]. Серед них найбільш шкідливими є вірус тютюнової мозаїки, вірус прожилкування петунії, вірус мозаїки помідорів, картопля вірус Y, вірус мозаїки люцерни, вірус огіркової мозаїки та вірус бобів. Часто ці віруси можуть провокувати змішані інфекції [23]. В рослинах петунії зазначені вірусні інфекції знижують декоративні властивості сортів, які згодом стають джерелом вірусу для незаражених рослин. Використанні інфікованих петуній у промисловому квіткарстві призводить до зниження якості рослин та їх привабливості, а як результат до значних економічних втрат. Однак, рослини петунії гібридної є також модельним об'єктом [146], які мають ряд переваг: як короткий термін генерації, легкість культивування, ефективний протокол генетичної трансформації, великі листя і квіти, придатні для ряду аналізів. Петунію також можна використовувати для тестування різних антивірусних стратегій [146].

Solanum tuberosum L. є надзвичайно важливою культурою, яка природно інфікується багатьма типами патогенів. Що стосується вірусних хвороб, то вони можуть бути причиною зниження врожайності, погіршення якості та товарної вартості бульб. Картопля може бути

заражена більш ніж 10 шкідливими вірусами [19], включаючи вірус PVY і PVX, які є найбільш шкодочиними [7].

1.3 Характеристика вірусу тютюнової мозаїки

Вірус тютюнової мозаїки вперше був виявлений в кінці 19-го століття Івановським [165]. TMV є типовим представником роду *Tobamovirus* [72]. Віріони жорсткі, паличкоподібної форми із спіральною симетрією, розміром 300 x 18 нм, без суперкапсиду, стійкі до дії зовнішнього середовища. Нуклеїнова кислота ВТМ представлена лінійною одноланцюговою молекулою (+) РНК. [72] довжиною 6395 нуклеотидів. РНК становить 5% від маси віріону. РНК оточена капсидом, утвореним з розташованих по спіралі нуклеїнової кислоти білкових субодиниць. Одним з головних вірусних білків є транспортний білок, який синтезується з ORF 4 (open reading frame – відкрита рамка зчитування), який зв'язується плазмодесмами та сприяє збільшенню їх діаметра [78]. Цей білок діє як молекулярний шаперон, зв'язуючись з вірусною РНК [78]. Вірус здатен поширюватися на досить великі відстані по рослині у комплексах, що називаються "вірус-специфічні рибонуклеопротеїни" [78]. Транспортний білок зв'язує нуклеїнову кислоту вірусу та обумовлює міжклітинний транспорт та транспорт провідними тканинами. Цей білок може інгібувати трансляцію мРНК *in vitro* [78]. Іншим важливим білком є капсидний білок, який кодується 3'-кінцевою ORF 5 і є найменшим за розміром — 17,5 кДа. Характерною його особливістю є здатність самоасамблювати у капсид за наявності РНК та певних значень іонної сили. Самозбірка здійснюється за законом мінімуму вільної енергії, без матриці і використання зовнішньої енергії. У неасембльованому стані, маючи 6 вільних поверхонь та 4-6 антигенних детермінант, капсидний білок ВТМ є сильним імуногеном [78].

Трансмісія TMV в природних умовах відбувається механічним шляхом через пошкодження поверхневих структур рослинної клітини. При

інокуляції листка чутливої рослини відбувається спочатку рух вірусів до кореневої системи, звідки віруси переносяться у верхні частини, потім транспортуються до середніх [25]. На тканинному рівні віруси рухаються від первинно-інфікованої клітини до оточуючих клітин, а потім до провідної системи рослини, що й призводить до системного транспорту вірусу [22]. Щоб вірус перейшов у флоему, він має пройти крізь плазмодесми межових клітин оболонки провідних пучків. Вихід віріонів з провідної тканини до непровідних тканин неінокульованих органів рослини здійснюється тим же шляхом, що і потрапляння [22]. Системний транспорт вірусу до інших органів прискорюється за рахунок переходу вірусу з паренхіми флоєми та клітин, які прилягають до ситоподібних трубок, якими вірус пересувається разом з потоком фотоасимілянтів [22]. Однак, оскільки вірус транспортується ефективно не у всіх властивих йому господарях, була висунута гіпотеза стосовно того, що рух вірусу по рослині вимагає певної сумісності вірус-кодованих факторів транспорту та компонентів господаря [76].

TMV є найпоширенішою моделлю для вивчення дії фітовірусних інфекцій на організм рослини через те, що його механізми дії та будова з'ясовані чи не найкраще порівняно з іншими фітовірусами [127].

1.4 Характеристика Y- вірусу картоплі

Y-вірус картоплі уперше був описаний у 1931 як вірус, що передається попелицями. PVY це типовий представник роду *Potyvirus* родини *Potyviridae* [67]. Вірус індукує широке різноманіття симптомів на листі та бульбах картоплі, що призводить до зниження врожайності та втрати якості врожаю. PVY проявляє чітку здатність еволюціонувати за рахунок накопичення мутацій і через рекомбінацію між різними штамми, адаптуючись до нових сортів картоплі [67]. Віріони прості, ниткоподібні, гнучкі, довжиною 730-740 нм, діаметром 11-12 нм, з аксіальним каналом

діаметром 2-3 нм, симетрія спіральна. Віріон містить 6% нуклеїнової кислоти та білок, зв'язаний з геномом VPg. Геном представлений одноланцюговою, лінійною молекулою (+)РНК ($3.1-3.2 \times 10^6$ Да), з полі(А) хвостом на 3'-кінці, та VPg на 5'-кінці. Реплікація відбувається у цитоплазмі за участю реплікаційного комплексу: NIb, CI, VPg. [67]. Під час реплікації у цитоплазмі утворюються включення. Більшість штамів PVY спричиняють утворення включень IV типу («колеса», спіралі, закручені агрегати). Вони складаються з єдиного неглікозильованого білка (67 кДа), що серологічно не пов'язаний із жодним вірусним або хазяйським білком. PVY також індукує утворення стрижнеподібних аморфних включень [67]. На рослинах картоплі багатьох сортів вірус викликає симптоми смугастої мозаїки. У чутливих сортів хвороба проявляється у вигляді посвітління жилок, крапчастості верхівок листя. Листки повністю некротизуються і висихають, залишаючись висіти на стеблі. На верхівках рослин некротизації не спостерігається. PVY передається при вегетативному розмноженні (бульбами, живцями) та попелицями, PVY легко передається соком [17]. Експериментальне коло хазяїв включає 495 видів рослин з 72 родів з 31 родини: 287 видів з родини *Solanaceae* (141 вид роду *Solanum* та 70 видів роду *Nicotiana*), 28 видів з *Amaranthaceae*, 25 видів з *Fabaceae*, 20 видів з *Chenopodiaceae* та 11 видів з *Asteraceae*. PVY має широкий спектр векторів-попелиць. Передача відбувається неперсистентним шляхом і залежить від вірусного HC-Pro та DAG триплету (Асп-Ала-Глі) у капсидному білку [17].

Методи протидії PVY полягають у боротьбі з переносниками (інсектициди, мінеральні олії), їх резервуарами, системній сертифікації посадкового матеріалу, виведення стійких сортів, у тому числі і використання трансгенних рослин [67].

Висновок до розділу 1. В сучасних наукових дослідженнях використовують різні підходи для отримання вірусостійких рослин. Можливим є використання як традиційних методів селекції, які поступово доповнюють поглибленим розумінням процесів рослинного захисту проти вірусів так і з використанням методів генетичної інженерії. Використання цих методів має як свої переваги так і недоліки, оскільки еволюційний процес не стоїть на місці. Генетична інженерія дозволяє підвищувати вірусостійкість рослин застосовуючи різні гени як вірусної так і не вірусної природи. Однак, на сьогоднішній день не створено універсального методу який би повністю захищав рослину від вірусів.

Результати розділу 1 опубліковані в **Потрохов А., Овчаренко О.** Стратегії створення стійких до вірусів рослин: фокус на РНКзах. *Цитологія і генетика*.2024. 58(2). С.24- 43.

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Вихідний матеріал

Вихідним матеріалом для роботи слугувало насіння тютюну *Nicotiana benthamiana* та *Nicotiana tabacum*. З колекції Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України було взято раніше отриманні трансгенні рослини *Solanum tuberosum* L з генами *bov* (екстраклітинн РНКаз А бика) та *ZRNase II* (екстраклітинна S-подібна РНКаз з *Zinnia elegans*), а також трансгенні рослини *Petunia*×*hybrida* з геном *ZRNase II*.

2.2 Поверхнева стерилізація насіння рослин *N. benthamiana* та *N. tabacum*.

Асептичні рослини отримували шляхом поверхневої стерилізації насіння. Для цього насіння послідовно витримували в 70% етанолі (30 сек.), 25% розчині комерційного препарату “Білизна” фірми “Мілам” (10 хв) та промивали тричі по 10 хв. в стерильній дистильованій воді.

Оброблене таким чином насіння висівали на чашки Петрі пророщували в темряві при +26°C в асептичних умовах на агаризованому безгормональному середовищі MS [88] та ½ MS. Склад живильного середовища предсталений в таблиці 2.1

Таблиця. 2.1 Склад живильних середовищ, які використовували в роботі (компоненти приведені у розрахунку на 1 дм³)

| Речовини | Вміст сполук у середовищах, г | |
|--|-------------------------------|--------|
| | MS | ½ MS |
| NH ₄ NO ₃ | 33,000 | 16,500 |
| KNO ₃ | 38,000 | 19,000 |
| MgSO ₄ × 7 H ₂ O | 7,400 | 3,700 |
| KH ₂ PO ₄ | 3,400 | 1,700 |
| CaCl ₂ × 2 H ₂ O | 8,800 | 4,400 |

| | | |
|---|--------|--------|
| H ₃ BO ₃ | 0,310 | 0,310 |
| MnSO ₄ × 5 H ₂ O | 0,1205 | 0,1205 |
| ZnSO ₄ × 7 H ₂ O | 0,530 | 0,530 |
| KI | 0,415 | 0,415 |
| Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O | 0,125 | 0,125 |
| CuSO ₄ × 5 H ₂ O | 0,025 | 0,025 |
| CaCl ₂ × 6 H ₂ O | 0,025 | 0,025 |
| Інозит | 0,1 | 0,1 |
| Біотин | 0,001 | 0,001 |
| Піридоксин | 0,1 | 0,1 |
| Тіамін | 0,1 | 0,1 |
| Нікотинова кислота | 0,01 | 0,01 |
| FeSO ₄ × 7 H ₂ O | 0,027 | 0,027 |
| Na-ЕДТА | 0,037 | 0,037 |
| Сахароза | 40,000 | 20,000 |
| Агар | 7,000 | 7,000 |
| pH середовища | 5,75 | 5,75 |

2.3 Субкультивування рослин *in vitro*

В експериментах використовували асептичні рослин, які культивували на середовищі MS або ½ MS. Після укорінення рослини розмножували живцюванням. Рослин росли в культиваційній кімнаті з при: температурі +24°C, 16-годинному світловому періоді, з інтенсивністю освітлення 4000 Люкс.

2.4 Культивування бактерій *A. tumefaciens*

Бактерії *A. tumefaciens* культивували на середовищі LB [14] з додаванням антибіотиків карбеніцилін 100 мг/дм³ та рифампіцин 50 мг/дм³. Склад середовища представлений в таблиці 2.2. Отриману

бактеріальну культуру вирощували протягом 48 годин при температурі +27⁰ С при постійному перемішуванні бактеріальної суспензії на шейкері Incubator shaker series 25 при 240 об/хв. Після нарощування, бактеріальні клітини осаджували на центрифугі Centrifuge 5415C при 300 об/хв 10 хв, осад ресуспендували в розчині 10мМ MgSO₄.

Таблиця. 2.2 Склад середовища LB (на 1 дм³)

| Речовини | Вміст сполук (г) |
|---------------------|------------------|
| Триптон | 10 |
| Дріжджовий екстракт | 5 |
| NaCl | 5 |
| pH | 7,0-7,2 |

2.5 Генетичні конструкції, які були використані в роботі

Листкові диски *N. benthamiana* трансформували AGL0 штамом *A. tumefaciens*, з вектором pBi-RNS. Т-ДНК вектора pBi-RNS включала ген *ZRNase II S*-подібної РНКазі з *Zinnia elegans*, під контролем p35S CaMV, промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV), і ген неоміцинофосфотрансферази (*npt II*), під контролем промотора нопалінсинтази pNOS. Регенерація і селекція рослин проходили на середовищі MS [88] з додаванням ВА 1 мг/дм³ та NAA 0,1 мг/дм³

Рослини з колекції Інституту містили в своєму геномі гени *bov* та *ZRNase II* які перенесені з плазмідних векторів pC27bov та pBi-RNS. Схеми векторів представлені на рисунку 2.1.

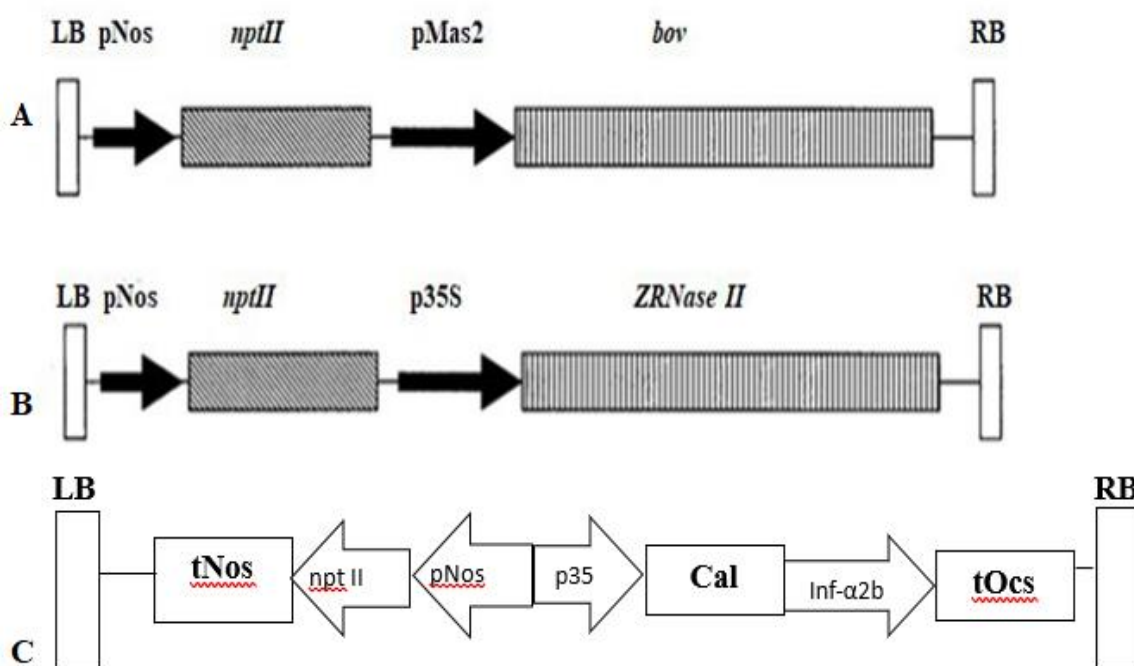


Рис 2.1. Генетичні карти векторів pC27bov (A), pbi-RNS (B) та pCB124 (C). LB, RB – ліва та права фланкуючі послідовності pNOS, промотор нопалінсинтази; *npt II*, ген неоміцин фосфотрансферази; pMas2, конститутивний промотор маннопінсинтази 2; *bov*, послідовність кДНК гена панкреатичної рибонуклеази *Bos taurus*; 35S, промотор вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV), *ZRNase II* – ген S-подібної РНКазы з *Zinnia elegans*; *ifn-α2b* – ген інтерферону α2b людини (35S промотор і OCS термінатор), *cal* – лідерна послідовність апопластного таргетингу.

Для трансформації рослин *N. tabacum* використовували бактерії *A.tumefaciens* штаму AGV3101, з вектором pCB124 під контрольований p35S CaMV, отриманий з вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV), і ген неоміцинофосфотрансферази (*npt II*), під контролем промотора нопалінсинтази pNOS.

2.6 Генетична трансформація рослин

Листкові диски *N. benthamiana* механічно пошкоджували та інкубували в суспензії *A. tumefaciens* 30 хв., потім культивували на агаризованому середовищі. На цьому середовищі листкові диски

інкубували дві доби. Після цього експланти переносили на агаризоване середовище MS з додаванням 500 мг/дм³ цефотаксиму та 100 мг/дм³ канаміцину в присутності фітогормонів ВА 1 мг/дм³ та NAA 0,1 мг/дм³

Генетичну трансформацію *N. tabacum* проводили за схемою: листкові диски механічно пошкоджували та інкубували в суспензії *A. tumefaciens* 30 хв., потім культивували на агаризованому середовищі. На цьому середовищі листкові диски інкубували дві доби. Після цього експланти переносили на агаризоване середовище MS з додаванням 500 мг/дм³ цефотаксиму та 100 мг/дм³ канаміцину в присутності фітогормонів ВА 0,05 мг/дм³, NAA 2,5 мг/дм³.

2.7 Визначення селективної концентрації антибіотика канаміцину для відбору трансформованих рослин

Для визначення селективної концентрації канаміцину проростки та насіння рослин висаджували на середовище MS з додаванням антибіотика канаміцину в концентраціях 0, 25, 50, 100 мг/дм³. Селективною концентрацією вважали таку концентрацію антибіотика, при застосуванні якої 100% отриманих рослин втрачали зелене забарвлення.

2.8 Виділення загальної ДНК рослин

Загальну ДНК виділяли листків рослин з використання набору реактивів DNAPro100 «Neogene» виробництва України. В пробірку вносили 100 мг зразку та додавали 400 мкл лізуючого агенту. Вміст пробірки ретельно перемішували та витримували в термостаті 5 хв при +65⁰C. Після цього суміш центрифугували 1 хв при 5000 об/хв та відбирали прозорий супернатант. До супернатанту додавали 20 мкл суспензії сорбенту та 10 хв змішували на ротаторі з подальшим центрифугуванням 5000 об/хв 1 хв. Після центрифугування обережно видаляли супернатант. До утвореного осаду додавали 200 мкл лізуючого агенту та змішували на вортексі до цілковитої гомогенізації. Далі в

пробірку додавали 1мл сольового буферу, вміст пробірки ретельно перемішували і центрифугували 1 хв при 5000 об/хв, супернатант відбирали (описані процедури повторювали тричі). Після заключного циклу відбирали супернатант, а осад висушували 5 хв при +65⁰С. До кожної дослідної пробірки вносили 100 мкл ЕкстраГен Е. Вміст пробірки суспендували 10 сек на вортексі до отримання гомогенної суміші. Отриману гомогену суміш термостатували 5 хв при +65⁰С. Оброблену суміш центрифугували 1 хв при 11000 об/хв. Отриманий супернатант переносили в чисті пробірки для подальших досліджень.

2.9 Проведення полімеразної ланцюгової реакція

Для підтвердження присутності генетичних вставок генів *bov* та *ZRNase II* в отриманих зразках загальної ДНК рослин проводили полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР).

Реакцію проводили на ампліфікаторі Mastercycler personal 5332 (Eppendorf) з термостатованою кришкою в пробірках з ультратонкими стінками. Реакційна суміш містила ПЛР-буфер із сульфатом амонію, 0,2 мкмоль відповідних праймерів 200 мкмоль кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів, 0.5 од Таq-полімерази, 10-50 нг ДНК-проби. Загальний об'єм суміші становив 20 мкл. Послідовність праймерів представлена в таблиці 2.3.

Таблиця 2.3 Послідовність праймерів, що використовувалася в роботі.

| Ген | Праймери | Розмір ампліфікованого фрагменту, п.н. |
|------------------|--|--|
| <i>bov</i> | F 5'- atcatggetctgaagttccc-3' R 5'- cctacacagtagcatcaaaag-3' | 450 |
| <i>ZRNase II</i> | F 5'- acactcgaagcacasaacatgaaga-3' R 5'- gaatctagaaatttagaatgaagga-3' | 720 |

| | | |
|----------------|--|-----|
| <i>ifn-α2b</i> | F 5'-ttgatgctcctggcacag-3', R 5'-ttctgctctgacaacctc -3' | 396 |
| 126 kDa TMV | F 5'-cgaactcatcggtgtat-3' R 5'-gctcgtgaccgcaggc-3' | 500 |

Для перевірки наявності генетичної вставки генів *bov*, *ZRNAse II* використовували комерційні праймери виробництва «Metabion» (Німеччина)

Праймери, специфічні до послідовностей генів *ifn-α2b* розроблено в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії з використанням програми FAST PCR. Умови проведення ампліфікації для генів *bov* та *ZRNAse II* були наступними: первинна денатурація +90⁰С 3 хв; 30 циклів ампліфікації при +94⁰С по 30с - +60⁰С 30с +72⁰С. Остаточна полімеризація проводилась при +72⁰С протягом 5 хв. Праймери послідовності, що відповідає білку 126 kDa ВТМ «Metabion» (Німеччина).

Умови проведення ампліфікації гена *ifn-α2b*: первинна денатурація +90⁰С, 3 хв; 30 циклів ампліфікації при +94⁰С по 30с - +60⁰С, 30с - +72⁰С, 30с. Остаточна полімеризація проводилась при +72⁰С протягом 5 хв.

2.10 Виявлення послідовностей мРНК генів RNS ЗТ-ПЛР у трансгенних рослинах петунії

Для доведення транскрибування перенесених генів у трансформованих лініях петунії проводили полімеразну ланцюгову реакцію, поєднану зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Для цього спершу проводили виділення загальної РНК з рослин *Petunia×hybrida*.

Для виділення РНК до 100 мг проби додавали 400 мкл меркаптоетанолу, зразок ретельно гомогенізували. До гомогенізованого зразка додавали 400 мкл кислого фенолу, перемішували та залишали на 20 хв на льодяній бані. Після чого додавали 80 мкл суміші хлороформ ізоамілового спирту, перемішували, залишали на 5 хв на льодяній бані.

Після цього проводили центрифугування впродовж 20 хв при 10000 об/хв при +4⁰С. Утворений супернатант відбирали, а до осаду додавали 80 мкл суміш хлороформу з ізоаміловим спиртом. Розчин центрифугували 5хв при 14000 об/хв на центрифугі Centrifuge 5415С. Відбирали супернатант і додавали 180мкл ізопропанолу для осадження і залишали 16 годин при -20⁰ С. Після центрифугували 10 хв, 10000 об/хв при +4⁰С. Відбирали супернатант і промивали двічі 70% етанолом. Після промивки 5 хв проводили центрифугування при 11000 об/хв на центрифугі Centrifuge 5415С. Супернатант відбирали, а отриманий осад висушували та додавали деіонізовану воду.

Отриманий препарат загальної обробляли ДНКазою I (вільної від РНКаз). Ці препарати використовували як матрицю для синтезу першого ланцюга кДНК (зворотних транскриптів) в реакції ЗТ-ПЛР.

Синтез кДНК проводили за інструкцією фірми-виробника, використовуючи стандартний набір реактивів фірми «Fermentas», Литва. 5 мкл реакційної суміші із специфічними праймерами до гена *ZRNAse II* використовували для подальшої ампліфікації кДНК. Щоб впевнитися, що проба РНК не містила залишків ДНК, яка може бути матрицею для ПЛР, застосовували негативний контроль в ролі якого, використовували 5 мкл реакційної суміші без додавання зворотної транскриптази. ДНК з агробактерій використовували як позитивний контроль.

2.11. Виявлення послідовностей мРНК TMV в інфікованих рослинах *N. tabacum*

Для виділення РНК до 100 мг проби додавали 400 мкл меркаптоетанолу, зразок ретельно гомогенізували. До гомогенізованого зразка додавали 400 мкл кислого фенолу, перемішували та залишали на 20 хв на льодяній бані. Після чого додавали 80 мкл суміші хлороформу ізоамілового спирту, перемішували, залишали на 5 хв на льодяній бані.

Після цього проводили центрифугування впродовж 20 хв при 10000 об/хв при +4°C. Утворений супернатант відбирали, а до осаду додавали 80 мкл суміш хлороформу з ізоаміловим спиртом. Розчин центрифугували 5хв при 14000 об/хв на центрифугу Centrifuge 5415C. Відбирали супернатант і додавали 180мкл ізопропанолу для осадження і залишали 16 годин при -20°C. Після центрифугували 10 хв, 10000 об/хв при +4°C. Відбирали супернатант і промивали двічі 70% етанолом. Після промивки 5 хв проводили центрифугування при 11000 об/хв на центрифугу Centrifuge 5415C. Супернатант відбирали, а отриманий осад висушували та додавали деіонізовану воду.

ПЛР ампліфікацію вірусних генів проводили з рослин *N. tabacum* після інфікування. В роботі використовували ампліфікатор Mastercycler personal 5332 (Eppendorf) з термостатованою кришкою в пробірках з ультротонкими стінками. Реакційна суміш містила одноразовий ПЛР-буфер із сульфатом амонію, 0,2 мкмоль відповідних праймерів 200 мкмоль кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів, 0,5 од Таq-полімерази, 10-50 нг ДНК-проби. Загальний об'єм суміші становив 20 мкл.

Для позитивного контролю використовували сумарну РНК нативного вірусу тютюнової мозаїки, отриманого і очищеного на кафедрі вірусології ННЦ «Біології та медицини» КНУ ім. Шевченка. Для визначення присутності вірусного продукту використовували специфічні праймери (див. таб. 2.3.). Умови ампліфікації: первинна денатурація – +94°C, 3 хв., 30 циклів ампліфікації (+94°C, 30 сек – +62°C, 30 сек – +72°C, 30 сек.), заключний синтез – +72°C, 5 хв.

2.12 Адаптація та вирощування рослин у тепличних умовах

Адаптацію рослин до тепличних умов проводили двома різними методами. Рослини картоплі висаджували мікробульбами в горщики

розміром 9 на 9 см, наповненні торф'яним субстратом TS1 («Klasmann», Німечинна).

Рослини тютюну та петуній проходили двостадійну фазу адаптації. Попередньо рослини виганяли до висоти 10 см на агаризованому середовищі MS в стерильних герметичних контейнерах. Підрощені таким чином рослини висаджували в 36 лункові мікроплати з субстратом TS1 та накривали кришкою, створюючи відповідну вологість повітря. Через 2-3 тижні кришку знімали, після акліматизації рослини пересаджували в горщики P9 для подальших експериментів.

Всі адаптовані рослини в зростали в тепличних контрольованих умовах. Умови в теплиці були наступні: температура +24°C, 16-годинний світловий період. Освітленість 20000 Люкс.

2.13 Інокуляція рослин вірусомісним матеріалом

Дослідні рослини інокулювали нативними вірусами, які були отримані на кафедрі вірусології ННЦ «Біології та медицини» КНУ ім. Шевченка. Вірусомісний матеріал для інфікування виділяли з рослин з симптомами вірусних інфекції. Для цього листя інфікованих рослин гомогенізували в фосфатному буфері (рН 7,4) (слад буферу наведений в таблиці 2.4) у співвідношенні 1:2. Отриманий гомагенат відфільтровували через марлевий фільтр та додавали хлороформ 7:1, пробірку струшували, витримували 20 хв для розділення фаз та відбирали верхню фазу для центрифугування з режимом 5000 об/хв протягом 20 хв. Відібрану надосадову рідину концентрували 5% ПЕГ 6000 та 1,2% NaCl протягом ночі при +4°C. Після інкубації центрифугували в режимі 12 тис об/хв 20 хв на центрифугі Centrifuge 5415C. Осад ресеспендували в 0,05 М фосфатному буфері з подальшим високошвидкісним центрифугуванням у режимі 24000 об/хв протягом 120 хв на ультрацентрифугі Optima L-90K з горизонтальним ротором SW 32.1. Утворений осад осаджували в 0,01М фосфатному буфері

на центрифугі Centrifuge 5415C у режимі 5000 об/хв. Отриманий вірусомісний матеріал зберігали при температурі -20°C .

Таблиця 2.4 Склад фосфатного буферу (з розрахунку на 1 дм^3)

| Речовина | Вміст речовини,г |
|--|------------------|
| NaCl | 8 |
| KH_2PO_4 | 0.2 |
| $\text{NaHPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ | 2.8 |
| KCl | 0.2 |

Інкулювання рослин проводилось шляхом механічної скарифікації вірусомісного препарату в молоде листя дослідних та контрольних рослин.

2.14 Визначення присутності вірусу в інфікованих рослинах та проведення імуноферментного аналізу

Наявність вірусу в інфікованих рослинах визначали за візуальними симптомами вірусної інфекції. Для визначення присутності вірусів тютюнової мозаїки та Y-вірусу картоплі, після візуальної діагностики ознак вірусної інфекції, з рослин відбирали уражене листя. Присутність вірусів підтверджували використовуючи метод імуноферментного аналізу.

Імуноферментний аналіз проводили використовуючи стандартний набір реактивів фірми «Loewe», Німеччина дотримуючись інструкцій виробника. Дослідження проводили мікрометодом у 96-лункових планшетах Sarstedt (Німеччина) у модифікації сендвіч.

Для цього 500 мг рослинного матеріалу гомогенізували у ступці з буфером зразка у співвідношенні 1:4. Буфер зразка складався з 2г полівінілпіролідону, знежиреного сухого молока 0,2 г та 0,5% Tween. Суміш центрифугували 10 хв 4000 об/хв при температурі $+4^{\circ}\text{C}$ на центрифугі Centrifuge 5415C. У лунки планшета додавали 100 мкл антитіл

захоплення у розведенні 1:200. Антитіла розводили в карбонатному буфері з рН 9,6. (таблиця 2.5)

Таблиця 2.5 Склад карбонатного буферу (з розрахунку на 1 дм³)

| Речовина | Вміст речовини, г |
|---------------------------------|-------------------|
| NaHCO ₃ | 5.760 |
| Na ₂ CO ₃ | 3.332 |

Планшети інкубували у термостаті 4 години за температури +37⁰С. Плашку ретельно промивали тричі по 3 хвилини буфером відмивки з рН 7,4. (таблиця 2.6)

Таблиця 2.6 Склад буферу відмивки (з розрахунку на 1 дм³)

| Речовина | Вміст речовини, г |
|----------------------------------|-------------------|
| NaCl | 8 |
| KCl | 0.2 |
| Na ₂ HPO ₄ | 1.44 |
| KH ₂ PO ₄ | 0.24 |

В усі лунки, крім контролю без антигена додавали по 100 мкл отриманого соку з інфікованих рослин та інкубували протягом ночі за температури +4⁰С. Після інкубації плашку промивали тричі по 3 хв буфером для промивки та додавали в усі лунки по 100 мкл антитіл виявлення в усі лунки, окрім контролю без антитіл виявлення. Антитіла попередньо були розведені в буфері зразка (рН 7,4), їх розведення склало 1:200. Плашку інкубували у термостаті 4 години за температури +37⁰С. Після цього плашку тричі промивали буфером відмивки та один раз натрій-фосфатним буфером. У кожную лунку додавали по 100 мкл субстрату пероксидази хрому. Вимірювання проводили через дві години на напівавтоматичному імуноферментному аналізаторі Rayto RT 2100 за довжині хвилі 405 нм.

2.15 Визначення вмісту продуктів ПОЛ та АОА в інфікованих рослинах

Вміст продуктів ПОЛ визначали за допомогою вимірювання вмісту дієнових кон'югатів та малонового диальдегіду.

Для визначення вмісту дієнових кон'югатів 1 г досліджуваного листового матеріалу розтирали в 5 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,4). Після цього до 1 мл гомогенату додавали 5 мл суміші гептану з ізопропіловим спиртом в співвідношенні 1:1. Отриману суміш центрифугували 10 хв. при 4000 тис. об/хв на центрифугі Centrifuge 5415С. В отриману надосадову рідину додавали 0,5 мл дистильованої води, розчин перемішували та відбирали 1 мл гептанової фази, до неї додавали 5 мл 96% етилового спирту. Оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 233 нм в кварцевих кюветах з ходом променю 10 мм.

Малоновий диальдегід визначали з екстрактів, отриманих за описаним вище методом. 3 мл гомогенату листя в об'ємі осаджували в 1 мл 5% трихлороцтової кислоти та центрифугували 10 хв 4000 об/хв на центрифугі Centrifuge 5415С. Після центрифугування 1 мл надосадової рідини переносили у пробірки і додавали по 1мл 0,8% тіобарбітурової кислоти та 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,4). Пробірки нагрівали на водяній бані протягом 10 хв та доводили до кипіння. Перед вимірюванням пробірки охолоджували до кімнатної температури. Оптичну густину розчину вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 532 нм в кварцових кюветах з ходом променю 1 см.

Для визначення загальної антиоксидантної активності до 1 мл досліджуваного екстракту додавали 0,2 мл 10 мМ розчину 2-дезоксирибози, 0,2 мл 0,1 мМ розчину комплексу $Fe^{2+}/EDTA$ та 0,2 мл 30% H_2O_2 . Об'єм отриманого розчину доводили фосфатним буфером до 2 мл.

Суміш інкубували 4 год при +37°C. Після інкубації додавали 1 мл 2,8% розчину трихлороцтової кислоти і 1 мл 1% розчину тіобарбітурової кислоти в 50 мМ розчині NaOH. Суміш нагрівали протягом 10 хвилин при 100°C. Виміри оптичної густини проводили при довжині хвилі 532 нм.

2.16 Визначення РНКазної активності

Визначення активності РНКаз в рослинах картоплі проводили за модифікованим методом Фіске – Суббароу. Для цього відбирали 200 мг листя рослин, яке гомогенізували в 2 мл ацетатного буферу. Отриману суміш центрифугували 20 хв 2500 об/хв на Centrifuge 5415С. Після центрифугування відбирали 0,5мл гомогенату та додавали 0,9 мл тотальної РНК дріжджів розчинної в 0,1 М ацетатному буфері з рН 5,2. Суміш інкубували 30 хв при температурі +25°C. Після інкубації додавали 0,5 мл 25% HClO₄ та витримували 20 хв у холодильнику при +4°C утворення осаду. Після утворення осаду суміш центрифугували 2500 об/хв 20 хв. Вимірювання оптичної щільності проводили на спектрофотометрі Unico 2800 при довжинах хвилі 260 нм та 275 нм.

Розрахунок активності проводився за формулою 1.

Формула 1. Розрахунок загальної РНКазної активності

$$(11,87 E_{260} - 10,4 E_{275}) \times 2 \times 1000 / (m:4)$$

E_{260} – величина оптичного поглинання за довжини хвилі 260 нм;

E_{275} – величина оптичного поглинання за довжини хвилі 275 нм;

m – маса наважки рослинного матеріалу.

Для рослин петунії та тютюну дослідження РНКазною активності проводили з використанням орцину [56]. Для цього 400 мг листя рослин гомогенізували в охолоджену буфері 0,05 М трис HCl (рН 7,5) з додаванням 0,15 М NaCl та 1 мМ N-етилмалеїміду. Загальний об'єм інкубаційної суміші становив 3 мл. Гомогенат центрифугували 20 хвилин при 6000 об/хв на центрифусі Centrifuge 5415С. Аліквоти отриманих

екстрактів використовували для визначення РНКазної активності. Для цього 0.5 мл екстракту інкубували в повторах 6 та 66 хвилин при +31°C, відповідно. До повторів додавали 1 мл 34% HClO₄ та центрифугували 20 хвилин при 6000 об/хв на центрифугі Centrifuge 5415C. До розчину додавали 1 мл орцинового реактиву. Розчин охолоджували та вимірювали при довжині хвилі 670 нм на спектрофотометрі Unico 2800.

2.17 Визначення особливостей розвитку системної вірусної реакції у рослин *Nicotiana benthamiana*, що експресують ген *ZRNase II*

Трансгенні рослини *Nicotiana benthamiana* з геном *ZRNase II* були використані як модельна система вірус-рослина для визначення можливих особливостей розвитку системної вірусної реакції.

Для цього контрольні та трансгенні рослини інфільтрували агробактеріальною суспензією, що містили векторну конструкцію pICH27566. Конструкція pICH27566 містить гени елементів PVX зокрема, що кодують вірусну РНК-полімеразу, білки потрійного генного блоку, білок оболонки та репортерний зелений флуоресцентний білок (*gfp*). Ця векторна конструкція підтримується в штамі GV3101 *Agrobacterium tumefaciens*. Для пригнічення процесів мовчання генів, яке може відбутися використанні конструкції pICH27566, використовували додатковий генетичний вектор pICH 6692, який містив супресор сайленссу вірусного походження. Конструкція pICH 6692 дозволяє уникнути замовкання генів

Схеми наведених векторів представлені на рисунках 2.2. та 2.3.

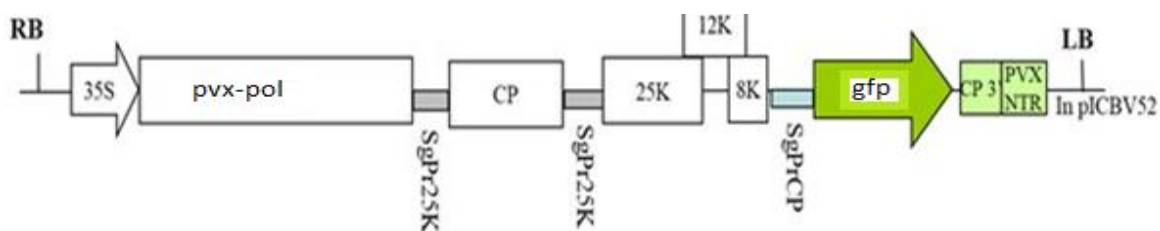


Рис 2.2 Схема вектора pICH 27566; 35S–35S промотор CaMV; *pvx-pol* – ген PVX РНК полімерази; SgPr25K – субгеномний промотор PVX білку 25K;

ср – ген білку оболонки PVX; 25k, 12k, 8k – гени які кодують білки PVX 25K, 12K, 8K; SgPrCP – субгеномний промотор білку оболонки PVX; gfp – ген GFP; CP 3'-3' кінець білку оболонки PVX; PVX NTR-3'UTR PVX.

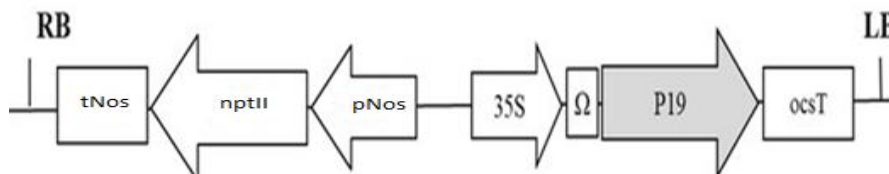


Рис 2.3 Схема допоміжного вектора pICH 6692; 35S–35S промотор CaMV; Ω-5' омега нетрасуючий регіон; p19 – ген білку P19 (супресор сайленсингу); ocsT – термінатор октапін синтетази; pNos, tNos – промотор і термінатор нопалін синтази; npt II – ген ген *nptII*

Поширення вірусних частинок по рослині виявляли візуально флуоресценцією GFP при опроміненні далеким синім світлом.

2.18 Визначення співвідношення антоціанів до хлорофілів в рослинах *Nicotiana benthamiana*, що експресують ген *ZRNase II*

Для визначення співвідношення хлорофілів до антоціанів використовували портативний аналізатор Opti-Sciences MPM-100. Суть методу полягає в простому і не інвазійному вимірюванні показників безпосередньо з рослини без необхідності відокремлювати листок та приготування рослинних екстрактів.



Рис 2.4 Вимірювання хлорофілів і антоціанів в рослинах *Nicotiana benthamiana* з використанням приладу Opti-Sciences MPM-100

Для вимірювання живий невідокремлений листок розташовують таким чином, щоб він був затиснутий датчиком. Після фіксації листкової пластинки в зоні дії датчику, промінь лазера проходить крізь листок і дозволяє детектувати пігментний склад зразка. Всі отримані дані виводяться на дисплей приладу.

2.19 Визначення метаболітів в трансгенних рослинах петунії та тютюну з використанням методу інфрачервона спектроскопії

Для проведення дослідів були відібрані контрольні та трансформовані рослини тютюну та петунії. На основі відкритих баз даних, була змодельовано типову спектрограму для рослин родини Solanaceae. Спектрограма представлена на рис. 2.5. ІЧ-спектри представлені по осі ординат у вигляді хвильового числа.

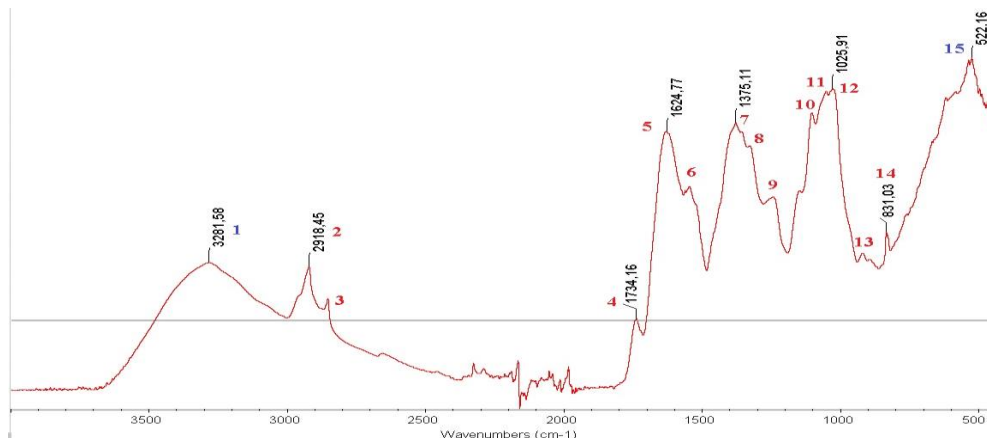


Рис. 2.5 Типова спектрограма для рослин родини Solanaceae при використанні методу інфрачервоної спектроскопії

1– вода; 2 – ліпіди кутикули листа/поверхні епідермального шару клітин; 3 – ліпіди кутикули листа (аліфатичні складні ефіри жирних кислот); 4 – ліпіди поверхні епідермісу (тригліцериди та жирні кислоти); 5 – амід I домен білків клітин епідермісу; 6 – амід II домен білків клітин епідермісу; 7 – целюлоза клітин епідермісу листа; 9 – нуклеїнові кислоти, ДНК, РНК клітин епідермісу листа; 10 – целюлоза/геміцелюлози клітин епідермісу листа; 11 – полісахариди клітин епідермісу листа; 12 – крохмаль клітин епідермісу листа; 13 – полісахариди клітин епідермісу листа; 14 – лігнін клітин епідермісу листа; 15 – фенілпропаноїди клітин епідермісу листа.

Аналіз зразків проводили з використанням інфрачервоного спектрометра Nicollet IS50 ATR-FTIR spectrometr, Thermo Fisher, USA.

Перед початком вимірювання оптичне вікно лазера протирали 96% етанолом, та добре висушували. За допомогою спеціального програмного забезпечення OMNIC Mercury GC Software, яким обладнаний прилад знімали показники фонового значення. Прилад автоматично знімає показники фону і враховує їх в подальшому при аналізі зразків. Вимірювання фонового значення необхідно проводити кожні 50 хвилин роботи приладу. Після отримання фонового графіку підготовленні зразки

розміщували лицевою стороною на поверхні оптичного вікна приладу та щільно притискали зажимним гвинтом, таким чином щоб мінімізувати потрапляння повітря в аналітичну область і максимально досягнути необхідної щільності прилягання зразка до аналізатора. Після закріплення знімали показники зразків з використанням програми OMNIC Mercury GC Software. Програма дозволяє проводити автоматично 35 повторних вимірювань з однієї точки дослідження і виводить на екран монітора графік який представляє собою середнє значення з усіх 35 промірів. На кожному з досліджуваних зразків відбирали 2-3 точки, таким чином, щоб у вікно аналізатора не потрапили жилки рослини. Таким чином з однієї лінії отримували 30 послідовних спектрограм. Після цього отримані спектрограми аналізували та проводили вимірювання площі піків за допомогою програми OMNIC 9.

2.20 Електронна мікроскопія інфікованих клітин *N. tabacum*

Для електронно-мікроскопічного аналізу використовували листкові висічки рослини *N. tabacum* діаметром 2 мм. Висічки фіксували розчином 3% глютаральдегіду ("Merck", Німеччина) в 0,1 М какодилатному буфері (рН 7,2) впродовж 3 годин з подальшою фіксацією 1% розчином тетраоксиду осмію в тому ж буфері, впродовж 1 години за кімнатної температури та 12 годин при +4°C. Зразки зневоднювали в етанолі зростаючої концентрації та вміщували у суміш епоксидних смол (Epon 812-Araldite). Поперечні сріблясто-золотисті зрізи (60±10 нм товщиною) листової пластинки отримували на ультрамікроскопі LKB 8800, фарбували цитратом свинцю й досліджували з використанням трансмісійного електронного мікроскопу JEM-1230 (JEOL, Токіо, Японія) за прискорюючої напруги 100 кВ. Морфометричний аналіз проводили за допомогою програми UTHSCSA Image Tool 3.0, використовуючи масштабну лінійку електронно-мікроскопічних зображень.

2.21 Визначення противірусної активності екстрактів рослин *N. tabacum* з геном *ifn- α 2b*

Визначення противірусної активності екстрактів рослин з геном інтерферону проводили за пригніченням цитопатичної дії вірусу у субстратзалежній культурі перещеплювальних клітин тестикул поросят (ПТП), вірусологічна лабораторія ДУ "Інститут отоларингології імені Коломійченка АМН України". Як тест-вірус використовували вірус везикулярного стоматиту (ВВС), штам Indiana з інфекційним титром $4,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/0,1$ мл з музею кафедри вірусології НМАПО імені П.Л.Шупика МОЗ України, попередньо адаптований до культури клітин ПТП. Як референтний препарат використовували рекомбінантний інтерферон людини альфа-2b з противірусною активністю 100 000 МО/мл виробництва НПО "Біофарма" Україна. Дослідження проводили мікрометодом у 96-лункових культуральних планшетах Sarstedt (Німеччина). У лунки планшета вміщували по 50 мкл живильного середовища RPMI-1640 без сироватки з додаванням антибіотиків. У паралельних рядах лунок готували дворазові серійні розведення від 2^{-1} до 2^{-10} досліджуваних зразків і препарату порівняння з початковою активністю 10 000 МО/мл. По 50 мкл суспензії клітин ПТП у концентрації $0,5 \cdot 10^6$ кл/мл в живильному середовищі RPMI-1640 з додаванням фетальної сироватки крові до 10 % і антибіотиків вносили у всі лунки планшета. Клітини культивували впродовж 18-24 годин при 37°C в атмосфері 5% CO_2 . Після повного формування клітинних моношарів, якість яких контролювали під інвертованим мікроскопом, у відповідні лунки планшетів вносили по 50 мкл тест-вірусу ВВС в інфекційній дозі $100 \text{ТЦД}_{50}/0,05$ мл.

Використовували наступні контролю (К-) – інтактні клітинні моношари и позитивний контроль (К+) – 100 інфекційних доз тест-вірусу,

повний прояв цитопатичної дії (ЦПД) тест-вірусу. Облік результатів проводили через 24 години після інфікування клітин тест-вірусом, за умов повного прояву ЦПД ВВС в лунках з К⁺ та відсутності порушення цілісності клітинних моношарів у лунках К⁻. За титр інтерферону вважали те розведення проби, при якому спостерігався захист 50 % клітинних моношарів від цитопатичної дії 100 інфекційних доз тест-вірусу.

Активність інтерферону у досліджуваних зразках розраховували за формулою 2.

Формула 2 розрахунок активності інтерферону на культурах клітин

$$N \text{ (МО/мл)} = A_{\text{досл.}} / A_{\text{реф.}} \times P$$

A_{досл.} – розрахована активність інтерферону досліджуваного зразка;

A_{реф.} – розрахована активність інтерферону референтного зразка

P – активність інтерферону референтного зразка в початковій концентрації в МО/мл.

Противірусну активність екстрактів рослин виражали в МО/мг маси і МО/г загального розчинного білка.

2.22 Статистична обробка

Для обробки статистичних даних використовували пакет програм MS Excel 2016 та програму STATISTICA-5.5. Експерименти повторювали по три рази для отримання статистично достовірних даних. В кожній групі використовували не менше ніж 10 рослин. Для оцінки статистичних відмінностей використовували дисперсійний аналіз та непараметричний тест U-критерій Манна-Уїтні.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ І ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Дослідження трансгенних рослин *N. tabacum* з геном інтерферону– *α2в* людини

Вихідні рослини *N. tabacum* дикого типу були взяті з *in vitro* колекції Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Ці рослини були трансформовані векторною конструкцією pCB124, яка містила в своєму складі ген *inf-α2в* людини.

3.1.1 Трансформації рослин *N. tabacum* геном інтерферону *α2в* людини

Для регенерації рослин використовували агаризоване середовище MS з додаванням фітогормонів ВА 0,05 мг/дм³, NAA 2,5мг/дм³. Встановлено, що оптимальним для регенерації пагонів було середовище MS яке містило фітогормони у концентрації 0,05 мг/дм³ ВА, 2,5мг/дм³ NAA (рисунок 3.1)

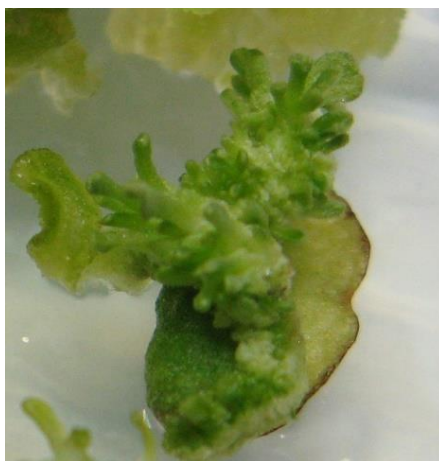


Рис 3.1 Регенерація пагонів *N. tabacum*.

Частота регенерації на цьому середовищі становила 100%, а ефективність 5-7 новоутворених пагонів на експлант. Новоутворені рослини фенотипово не відрізнялися від контрольних рослин. Використання цього середовища дозволило отримувати регенеранти рослин для подальших досліджень.

3.1.2 Молекулярно-біологічний аналіз рослин *N. tabacum*

Для перевірки наявності генетичної вставки у потенційно трансформованих рослин проводили молекулярно-біологічний аналіз. Наявність перенесених генів визначали методом ПЛР.

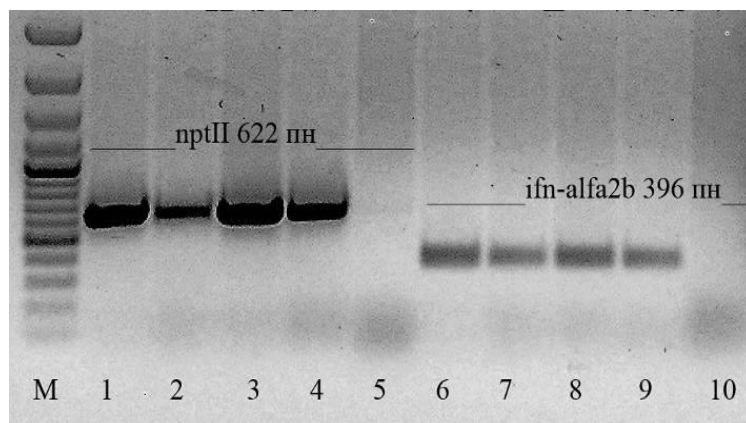


Рис.3.2 Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК рослин *N. tabacum* з праймерами, специфічними до генів *ifn- α 2b* та *npt II*; М – маркер; 1-4, 6-9 – ДНК трансформованих рослин; 5, 10 – ДНК контрольних рослин

Аналіз отриманих рослин показав наявність рослини *N. tabacum* було виявлено, що у всіх досліджуваних зразках була наявна генетична вставка гена *ifn- α 2b*.

3.1.3 Визначення інтерферон-подібної активності екстрактів рослин *N. tabacum* з геном *ifn- α 2b* людини

Інтерферон є первиною ланкою захисту в організмі ссавців від вірусних інфекцій, однак його вплив на рослинні віруси потребував з'ясування. Перед інфікуванням TMV було проведено дослідження по визначенню активності перенесеного гена з використанням культури клітин ПТП. Культура клітин була інфікована вірусом везикулярного стоматиту людини.

В екстрактах трансгенних рослин виявлена інтерферонподібна активність, яка варіювала від 3274 до 6312 МО/г маси в залежності від лінії трансгенних рослин (таблиця 3.1).

Таблиця 3.1 Інтерферонподібна активність на культурі клітин ПТП

| № лінії | Вміст інтерферону, пг/г маси | Активність МО/г маси |
|---------|------------------------------|----------------------|
| №1 | 1123,328 | 3274 |
| №2 | 1017,151 | 6312 |
| №3 | 2295,392 | 5000 |

Для перевірки інтерферон подібної активності також використовували лінію клітин мишиних фібробластів L41. Однак, в результаті на даній культурі клітин інтерферон подібної активності не спостерігали. Можливо, це було пов'язано з тим, що структура молекули інтерферону, який синтезувався в організмі отриманих трансгенних рослин, відрізнялась від структури молекул інтерферону, синтезованих клітинами ссавців.

3.1.4 Інфікування рослин *N. tabacum* та їх аналіз

Рослини *N. tabacum* інфікували вірусом TMV. Зразок TMV був отриманий зі зразків кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Як контроль використовували рослини дикого типу. Інфікування проводили шляхом механічної інокуляції вірусомісного препарату в молоде листя рослин.

В результаті через 2 тижні після інфікування були зафіксовані симптоми вірусного ураження рослин. Вірусна інфекція викликала деформацію листкової пластинки та утворення помітної мозаїчності. Симптоми інфекції в трансформованих рослинах не були відтерміновані у часі і з'являлися одночасно з проявом аналогічних симптомів в рослинах дикого типу. Візуально симптоматична інфекції картина була однаковою.



Рис. 3.3 Зовнішній вигляд листків рослин *N. tabacum*;

1 – контрольна інфікована рослина; 2 – контрольна неінфікована рослина;
3 – трансформована інфікована рослина; 4 – трансформована неінфікована рослина.

Одноточасний характер прояву візуальних симптомів та їх тяжкість вказував на те, що в рослинах не відбувалося помітних змін в розвитку інфекційних процесів. Для підтвердження наявності у вірусу в рослинах було проведена реакція ЗТ-ПЛР.

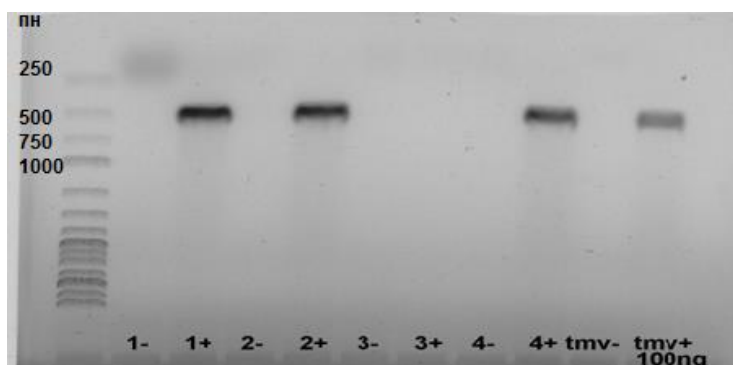


Рис. 3.4 Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР-аналізу тотальної РНК рослин з геном *ifn-α2b* інфікованих TMV;

1, 2 – рослини з геном *ifn-α2b*; 3 – контрольні неінфіковані рослин; 4 – контрольні інфіковані рослини; tmv – нативний препарат вірусу (– без ЗТ, + з ЗТ).

В результаті проведеного аналізу встановлено, що TMV дійсно персистував в організмі *N. tabacum*. Виявлено, що в трансгенних рослинах

з геном інтерферону затримки інфекційного процесу спричиненого TMV не відбувалося.

3.1.5 Дослідження ультраструктури клітин інфікованих рослин *N. tabacum*

Подальші дослідження було спрямовано на визначення впливу розвитку вірусної інфекції на трансгенні рослини з геном інтерферону на ультраструктурному рівні. Для цього було проведено електронно-мікроскопічне дослідження на поперечних зрізах листкової пластинки рослин *N. tabacum*. Морфометричний аналіз клітин та органел проводили на їх діаметральних зрізах.

Досліджуючи отримані зрізи з неінфікованих рослин, було виявлено характерні вакуолізовані клітини мезофілу. На діаметральних зрізах клітин в середньому виявлялося 12-13 хлоропластів, які розташовувалися переважно по периферії, в безпосередній близькості до цитоплазматичної мембрани. Їх строма характеризувалася слабо розвинутою внутрішньою мембранною системою, представленою тилакоїдами, гранами та крохмальними зернами. Така будова клітин була характерна як для трансгенних рослин, так і контрольних. Отже, генетична трансформація не призводила до зміни морфології клітин рослин.

Після інфікування рослин в клітинах мезофілу, накопичувалася значна кількість вірусних часток, які виявлялися у вигляді агрегатів віріонів у гіалоплазмі. Віріони були присутні у центральній вакуолі у вигляді розсіяних вірусних часток. Агрегати виявлених віріонів у гіалоплазмі за розмірами наближалися до розмірів окремих хлоропластів, що розташовувалися уздовж клітинної оболонки. На зрізах агрегатів спостерігалися як повздовжні профілі щільно розташованих між собою віріонів, так і поперечні (Рис. 3.5). Довжина окремих віріонів складала 300 ± 50 нм, з діаметром 16 ± 1 нм та діаметром центральної порожнини

(просвіту) – 4 нм. Цитоплазматичні агрегати, виявлялися як в ділянках, де відбувається безпосередній контакт клітинних оболонок суміжних клітин, так і в ділянках, в яких контакт клітинної оболонки з іншою клітиною був відсутній. Віріони були присутні як в контрольних рослинах дикого типу, так і в трансгенних рослинах. У вакуолях деяких клітин трансгенних рослин окрім розсіяних окремих віріонів виявляли ділянки цитоплазми з агрегатами щільно розташованих віріонів та мультивезикулярними тілами. Мультивезикулярні тіла, вірогідно, відшнуровувалися від основної цитоплазми внаслідок автолітичних процесів.

В організмі уражених рослин були помічені зміни структурної організації хлоропластів. В частині органел інфікованих трансгенних рослин відзначали розширенні тилакоїди строми. Окрім того, розмірів пластоглобул зменшувався. Так, в хлоропластах не інфікованих рослин їх розмір становив 200 ± 30 нм, а після інфікування 170 ± 25 нм.

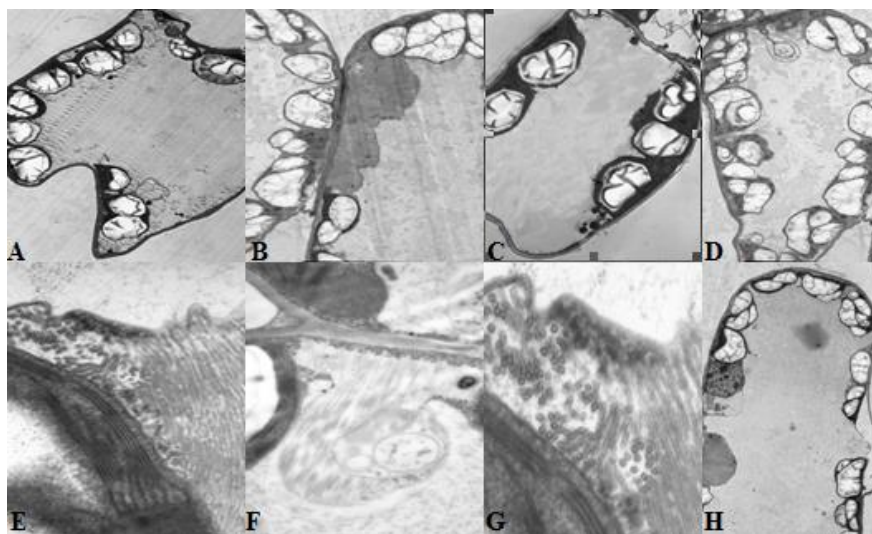


Рис. 3.5 Електронно-мікроскопічне дослідження ультраструктури клітин тютюну;

А – ультраструктура клітини не інфікованої рослини дикого типу (збільшення 2К); В – ультраструктура клітини інфікованої рослини дикого типу (2К); З – ультраструктура клітини рослини з геном *ifn-a2b*, не інфікованої TMV (2К); D – ультраструктура клітини рослини з геном *ifn-*

a2b, інфікованої TMV (2K); E – вірусні агрегати в клітині рослини дикого типу (30K); F – формування везикулярного тіла в клітині інфікованої рослини дикого типу (20K); G – вірусні агрегати в клітині рослини з геном *ifn-a2b*, інфікованої TMV (80K); H – плазмоліз клітинної стінки в клітині дикого типу (2K)

Хлоропласти інфікованих рослин у порівнянні з контрольними були менші розмірами та з нижчим вмістом крохмалю. Характерною ультраструктурною ознакою хлоропластів клітин інфікованих рослин було формування у стромі 2-3-х крохмальних зерна. В клітинах не інфікованих рослин, як контрольних так і трансгенних, було лише одне велике крохмальне зерно, що займало 81% площі перерізу органел.

При дослідженні інших органел клітини на діаметральному зрізі виявляли мітохондрії переважно округлої, овальної, рідше видовженої форми, які характеризувалися тенденцією до підвищення кількості крист у органелах трансгенних рослин при порівнянні з контрольними.

В гіалоплазмі клітин мезофілу виявляли вільні рибосоми, полірибосоми; диктіосоми з 4-5 цистернами та незначною кількістю везикул Гольджі, а також короткі цистерни гранулярного й агранулярного ретикулуму. Клітинні стінки суміжних клітин мезофілу були пронизані плазмодесмами. Середня товщина клітинних стінок збільшувалась у місцях локалізації плазмодесм з 220-240 до 300-320 нм без помітних змін в структурній організації.

Аналіз вірусоіндукованих змін структурної організації клітин мезофілу показав вищу частоту появи мультивезикулярних тіл, які локалізувалися як в гіалоплазмі, так і вакуолях. Вірогідно, їх збільшення означало підвищений рівень автолітичних процесів плазмолізу в інфікованих рослинах. Так, ще в 1968 році при дослідженні цитологічних змін в інфікованих клітинах було виявлено, що TMV утворює специфічні

гранулярні та трубчасті включення, так звані Х-тіла [38]. Показано [50], що в інфікованих TMV рослинах спостерігали активацію лізосом та спостерігали аморфні кристалічні включення вірусів в ядрах інфікованих клітин.

В представлених дослідженнях було показано, що електронно-мікроскопічний аналіз клітин *N. tabacum* не виявив істотних відмінностей в ультраструктурі клітин трансгенних рослин. Можна стверджувати, що генетична трансформація не призвели до змін структури клітин, зокрема, хлоропластів, ядер, мітохондрії, клітинної стінки.

Ультраструктура клітин трансгенних рослин, інфікованих TMV, не мала значних відмінностей від ультраструктури клітин контрольних інфікованих рослин. В інфікованих клітинах накопичення віріонів, їх локалізація, а також морфологічні зміни, які проявлялися в частковому плазмолізі, збільшенні крохмальних зерен і в формуванні везикулярний тіл, не відрізнялися.

3.6 Оцінка розвитку стресових реакцій у інфікованих рослин *N. tabacum*

Після проведення цитологічних досліджень рослин *N. tabacum* було досліджено вплив фітовірусної інфекції на перебіг біохімічних процесів в організмі цих рослин за показниками ПОЛ та АОА. Аналіз показав, що після інфікування вміст продуктів ПОЛ змінювався. В не інфікованих рослин дикого типу вміст ДК був 0,63 мкМ/мг, в той час як після інфікування вміст ДК збільшувався до 1,3 мкМ/мг. В трансгенних рослинах інфікування навпаки, спричинювало зниження ДК. У не інфікованих трансгенних рослинах вміст ДК становив $1,8 \pm 0,06$ мкМ/мг, а в інфікованих $0,13 \pm 0,013$ мкМ/мг. (рисунок 3.6)

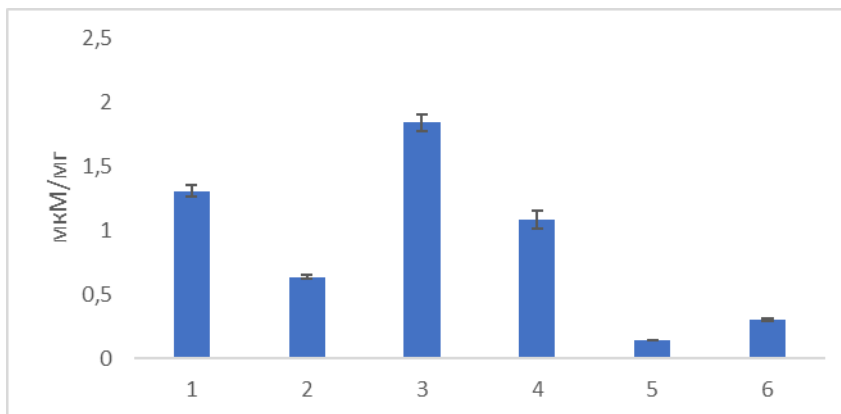


Рис. 3.6 Вміст дієнових кон'югатів в рослинах *N. tabacum* L.

1– неінфіковані рослини дикого типу; 2 – інфіковані рослини дикого типу; 3, 4 – неінфіковані рослини з геном *ifn-α2b*; 5, 6 – інфіковані рослини з геном *ifn-α2b*

В неінфікованих рослинах дикого типу вміст МД склав $0,2+0,008$ мкМ/мг. Після інфікування TMV вміст МД збільшився до $0,3+0,01$ мкМ/мг, що, можливо свідчить про негативний вплив фітовірусу на проходження метаболічних процесів в рослині. В трансгенних рослинах після інфікування вміст МД знижувався. Так, у не інфікованих трансгенних рослинах вміст МД становив $0,33+0,01$ мкМ/мг, а після інфікування $0,08+0,002$ мкМ/мг. (рисунок 3.7)

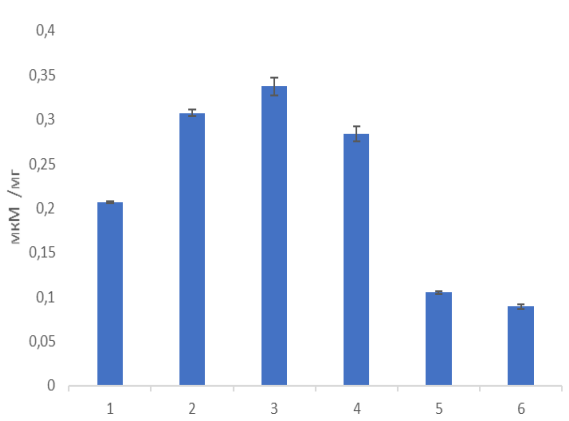


Рис. 3.7 Вміст малонового діальдегіду у рослинах *N. tabacum* L.

1– не інфіковані рослини дикого типу; 2 – інфіковані рослини дикого типу; 2, 3 – не інфіковані трансгенні рослини; 5, 6 – інфіковані трансгенні рослини.

Результат дослідження загальної АОА показав, що у рослин дикого типу АОА практично не змінювалась після інфікування. До інфікування активність була на рівні 58 мкМ МД/г сирової маси, а після – 56 мкМ МД/г залишкового малону.

В трансгенних рослинах після інфікування АОА підвищувалася. У не інфікованих трансгенних рослинах АОА становила $43,7 \pm 0,12$ мкМ/мг, а після інфікування $48 \pm 0,12$ мкМ/мг (рисунок 3.8).

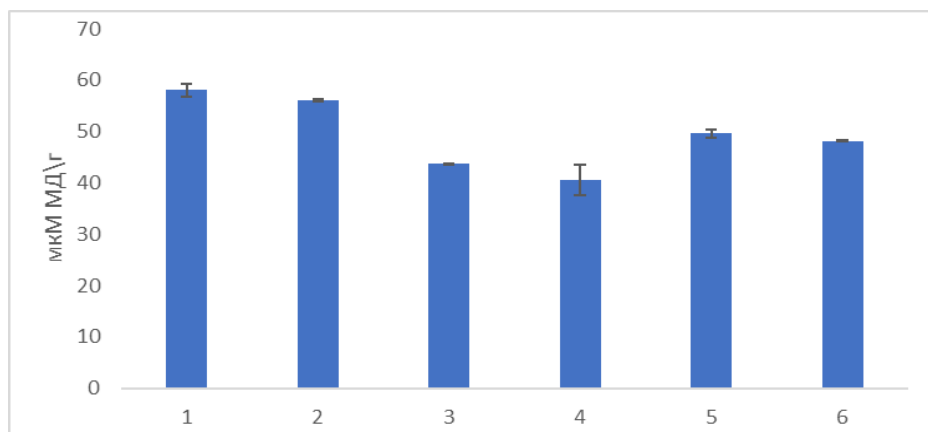


Рис. 3.8 Антиоксидантна активність у рослинах *N. tabacum* L.

1– неінфіковані рослини дикого типу; 2 – інфіковані рослини дикого типу; 3, 4 – неінфіковані рослини з геном *ifn-α2b*; 5, 6 – інфіковані рослини з геном *ifn-α2b*.

Високий рівень АОА в трансгенних рослинах, може свідчити про те, що в трансформованих рослинах посилюється адаптація до несприятливих стресових факторів біотичного характеру.

Аналізуючи отримані дані можна припустити, що трансгенні рослини з геном інтерферону, хоча і не мали вираженої зміни вірусостійкості, однак були здатні адаптуватися до стресових умов, викликаних вірусом.

Висновки до розділу 3.1 Методом агробактеріальної трансформації були отримані трансгенні рослини *N. tabacum* з геном *ifn-α2b*. В цих рослинах було підтверджено наявність гена інтересу. Білковий продукт гена *ifn-α2b* був активний проти вірусу везикулярного стоматиту на культурі клітин ПТП. Однак, незважаючи на виявлену протівірусу активність, трансгенні

рослини не мали ознак стійкості до TMV, хоча і виявляли тенденцію до підвищення адаптаційної спроможності. В інфікованих трансгенних рослинах не спостерігали затримки розвитку фітовірусної інфекції. В той же час у трансгенних рослинах не було виявлено змін ультраструктури клітин порівняно з контролем, а після інфікування TMV патологічні зміни не відрізнялися від контролю. Таким чином було встановлено, що ген *ifn- α 2b* не впливав на розвиток інфекції викликану TMV.

Для досягнення цілей роботи подальші дослідження проводили з використанням інших гетерологічних генів, а саме рибонуклеаз. Було досліджено рослини *Solanum tuberosum*, *Petunia \times hybrida* та *Nicotiana benthamiana*.

Власні дослідження цього розділу представлені в:

Потрохов А. О. Антиоксидантна активність трансгенних рослин *Nicotianatabacum*L з геном *ifn- α 2b* людини, інфікованих вірусом тютюнової мозаїки наук. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол.* 2015, № 2(63) С. 58-64.

Потрохов А. О., Зубр З. В, Трохименко О. П., Матвєєва Н. А. Оцінка противірусної активності екстрактів із трансгенних рослин тютюну з геном інтерферону α -2b людини. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол.* 2017. 3(70) С.64-69.

Potrokhov A., D. Klymchuk, Yu. Akimov, N. Matvieieva, E. Trokhimenko, I. Dzuyblyk, M. Kuchuk Ultrastructural characteristics of mezophyll cells of transgenic tobacco plants with human interferon alpha 2b gene infected by tobacco mosaic virus. *Genetics and Plant Physiology.* 2014. 4(3-4). P. 174–181

РОЗДІЛ 3.2 Дослідження трансгенних рослин *Solanum tuberosum*

Рослини *Solanum tuberosum* були взяті з колекції трансгенних рослин інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. В роботі використали колекційні сорти *S. tuberosum* L.: Ласунак, Лугівська та Слов'янка.

Згідно заявлених розробниками паспортних даних ці сорти мають низку характерних ознак, які відрізняють їх по відношенню до вірусних хвороб.

Сорт Ласунак був створений і виведений білоруським Інститутом картоплярства і плодоовочівництва. Він є районованим до зони українських лісостепів та Полісся, характеризується високою стійкістю до бактеріальних та вірусних хвороб картоплі.

Сорт Лугівська був виведений Інститутом картоплярства Аграрної академії наук України. Його рекомендують вирощувати в зонах лісостепів та Полісся. Заявлено, що він має високу стійкість до бактеріальних інфекцій але недостатню для вірусних.

Сорт Слов'янка також виведений для українських лісостепів і Полісся, Інститутом картоплярства Аграрної академії наук України. Сорт Слов'янка позиціонується як вірусотолерантний сорт. В представлених дослідженнях цей сорт був використаний як додатковий контроль. Трансформовані лінії цього сорту не використовувалися.

3.2.1 Молекулярно-біологічний аналіз рослин *S. tuberosum*

Відібрані зразки були створені і отримані ще в 2012-2013, тому перед початком досліджень необхідно було впевнитися в збереженні цільових генів в геномі рослин. В роботі використовували рослини з генами *ZRNase II* та *bov*.

Аналіз трансгенних колекційних зразків *S. tuberosum* методом ПЛР підтвердив наявність трансгенів, що дало можливість використовувати їх в подальших дослідженнях. (рисунок 3.9)

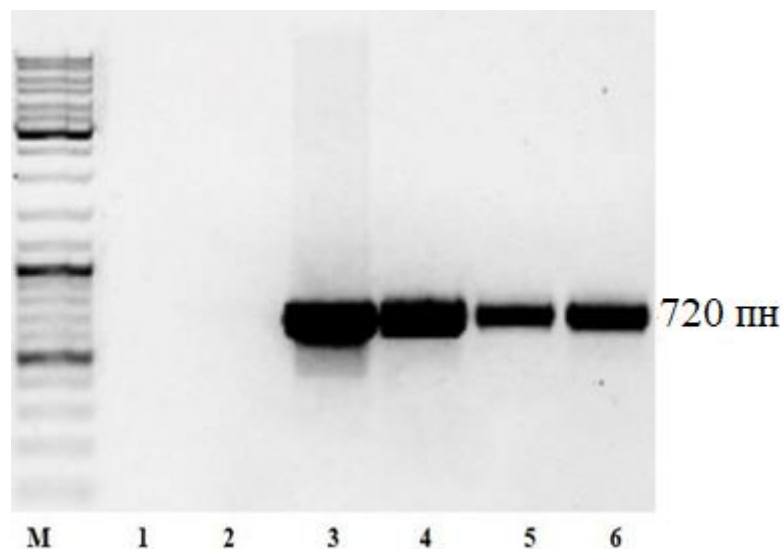


Рис 3.9 Електрофореграма продуктів ПЛР з праймерами, специфічними до гена *ZRNase II* в рослинах *S. tuberosum*.

М – маркер молекулярної маси; 1 – негативний контроль; 2 – нетрансформована рослина сорту Лугівська; 3 – позитивний контроль (плазмідна ДНК); 4, 5, 6 – трансформовані рослини сорту Лугівська

Було підтверджено, що колекційні трансгенні рослини здатні зберігати цільовий ген *ZRNase II*, а отже можуть бути використані для подальших досліджень.

З колекції інституту було взято також трансгенні рослини картоплі з геном *bov*, що кодує бичачу ендорибонуклеазу А. ПЛР аналіз також підтвердив збереження цільового гена в цих рослинах (рисунок 3.10).

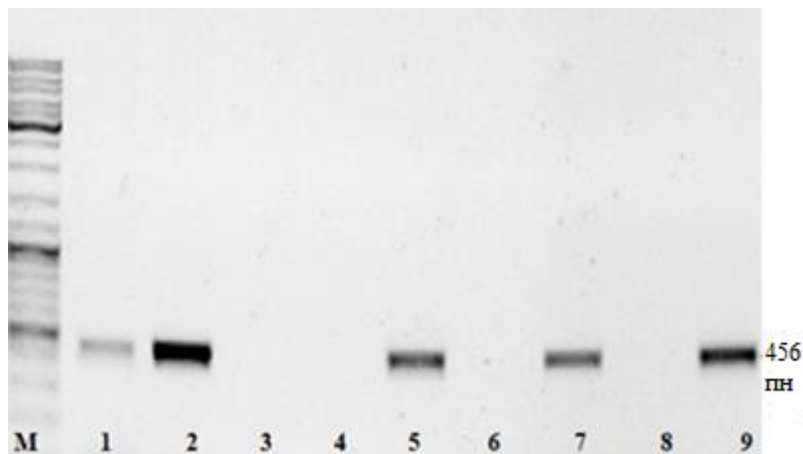


Рис 3.10 Електрофореграма продуктів ПЛР з праймерами, специфічними до гена *bov* в рослинах *S. tuberosum*.

М – маркер молекулярної маси; 1, 5 – трансформовані рослини сорту Лугівська; 2 – позитивний контроль (плазмідна ДНК); 3 – негативний контроль без ДНК; 4, 6, 8 – нетрансформовані рослини сортів Слов'янка, Лугівська та Ласунак, відповідно; 7, 9 – трансформовані рослини сорту Ласунак

В результаті проведеного аналізу було підтверджено присутність трансгенів у рослинах сортів Лугівська та Ласунак з геном *bov*. Таким чином підтверджено стабільну трансформацію рослин *S. Tuberosum* з різними генами рибонуклеаз.

3.2.2 Адаптація *S. tuberosum* до тепличних умов та їх вирощування

Після підтвердження присутності цільових генів, було розпочато акліматизацію рослин до умов *ex vitro*. Необхідно зазначити, що сам процес акліматизації є критичним моментом для рослин. При такому переході рослинам необхідно адаптуватися до нових умов існування. Оскільки рослини, які зростають *in vitro*, знаходяться в закритому об'ємі та зростають при 100% вологості, такі рослини мають значно тоншу клітинну стінку, слабкіші корені, вони не адаптовані до перепаду температури та вологості. Одним з критичних моментів адаптації рослин є підтримання високої вологості повітря впродовж перших двох тижнів адаптації.

В результаті проведених досліджень було встановлено, що найкращим методом адаптації рослин *S. tuberosum* є використання їх мікробульб. При висадці мікросаджанців лише 25-30% відтоків рослин приживалися в умовах ґрунту. При використанні мікробульб цей показник наближався до 90%. Для цього мікробульби картоплі висаджували в горщики Р9 (9см×9см), наповненні торф'яним субстратом TS1 («Klasmann», Німеччина). Горщики переміщували в теплицю (рисунок 3.11.)



Рис 3.11 Рослина картоплі сорту Слов'янка через місяць після проростання з мікробульб.

Рослини *S. tuberosum* проростали через 3 тижні після висадки. Відмінність у кількості проростків між контрольними і трансгенними рослинами не спостерігали. Повноцінно готовими до роботи рослини стали через два місяці після проростання. Фенотипово отримані рослини не відрізнялися від дикоростучих рослин даного виду.

В результаті роботи були отримані здорові акліматизовані рослини всіх досліджуваних сортів картоплі, які були використані в подальших дослідженнях. Перед інфікуванням рослин визначали загальну РНКазну активність.

3.2.3 Визначення загальної РНКазної активності в трансформованих рослинах *S. Tuberosum*

Дослідження загальної активності РНКаз проводили для оцінки рівня базового рівня РНКаз в рослинах. В процесі дослідження проводили порівняння РНКазної активності між трансгенними рослинами і контролем. В якості додаткового контролю визначали активність в рослинах вірус толерантного сорту Слов'янка.

Аналіз загальної РНКазної активності в рослинах картоплі представлений на рисунку 3.12.

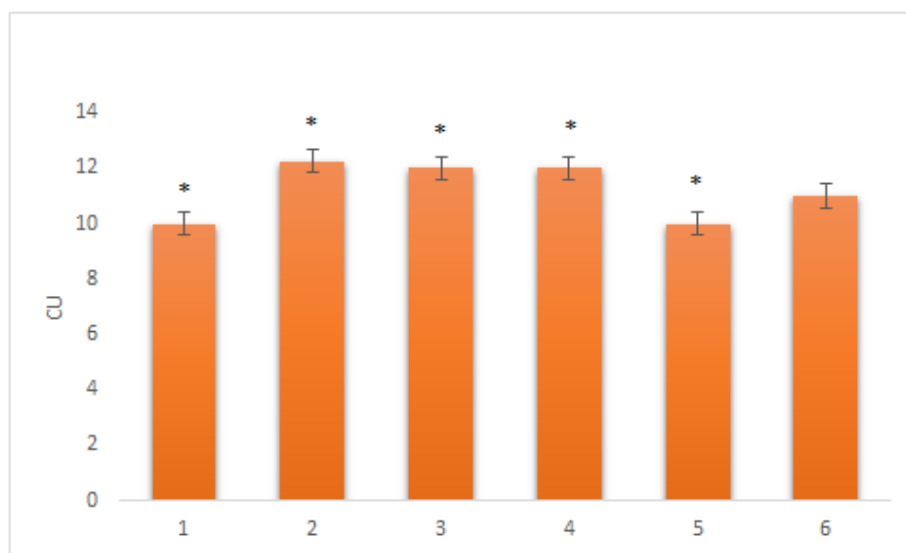


Рис 3.12 Загальна активність РНКаз в екстрактах листя *S. tuberosum*

1 – рослина сорту Лугівська; 2 – трансформовані рослини сорту Лугівська з геном *ZRNase II*; 3 – трансформовані рослини сорту Лугівська з геном *bov*; 4 – трансформовані рослини сорту Ласунак з геном *bov*; 5 – рослина сорту Ласунак; 6 – рослина сорту Слов'янка; CU – умовна одиниця, * $P \leq 0,05$.

Загальна РНКазна активність усіх досліджуваних вихідних рослин дикого типу була на рівні 10-11 умовних одиниць. Виявлено, що порівняно з іншими сортами сорт Слов'янка мав найвищий рівні активності РНКаз, який становив 11 умовних одиниць. В трансгенних рослинах сортів Ласунак і Лугівська було виявлено, що такі рослини мають вищі рівні

активності РНКаз порівняно з відповідними сортами рослин дикого типу. Найбільшу активність мали екстракти з трансгенних рослин сорту Лугівська, що містять ген *ZRNase II*. В цих рослинах активність склала 13 умовних одиниць. РНКазна активність трансгенних рослин сортів Лугівська та Ласунак з геном *bov* склала 12 умовних одиниць, що перевищувало показники активності у нетрансформованих рослин відповідних сортів. Такими чином встановлено, що перенесення генів рибонуклеаз в рослини сортів Ласунак і Лугівська підвищувало загальну РНКазну активність в середньому на 2-3 умовні одиниці. Отже, генетична трансформація призводила до змін активності РНКаз в рослинах.

3.2.4 Інфікування рослин *S. tuberosum* PVY та підтвердження ураження

Після аналізу загальної РНКазної активності проводили інфікування рослин. Кожен експеримент з інфікування рослин проводили у шести повторях, за повтор вважали групу із 15 рослин. Візуально спостерігали розвиток симптомів вірусної інфекції.

Інфікування трансгенних рослини картоплі проводили методом інокуляції вірусомісного препарату PVY шляхом його механічного втирання в поверхню листової пластинки. Зразок PVY був виділений з рослин томатів з вираженими важкими симптомами вірусної інфекції, який був отриманий з кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. В якості контролю інфікували контрольні не трансформовані рослини сортів Лугівська та Ласунак та додатково толерантний сорт картоплі Слов'янка.

В контрольних рослинах ознаки вірусної інфекції спостерігалися через три тижні після інокуляції рослин вірусом. Симптоми інфекції PVY включали: скручування нижніх листків, утворення жовтих плям га листі,

некрози стебел і жилок, концентричні некрози на листках, затримку росту (рисунок 3.13, 3.14).

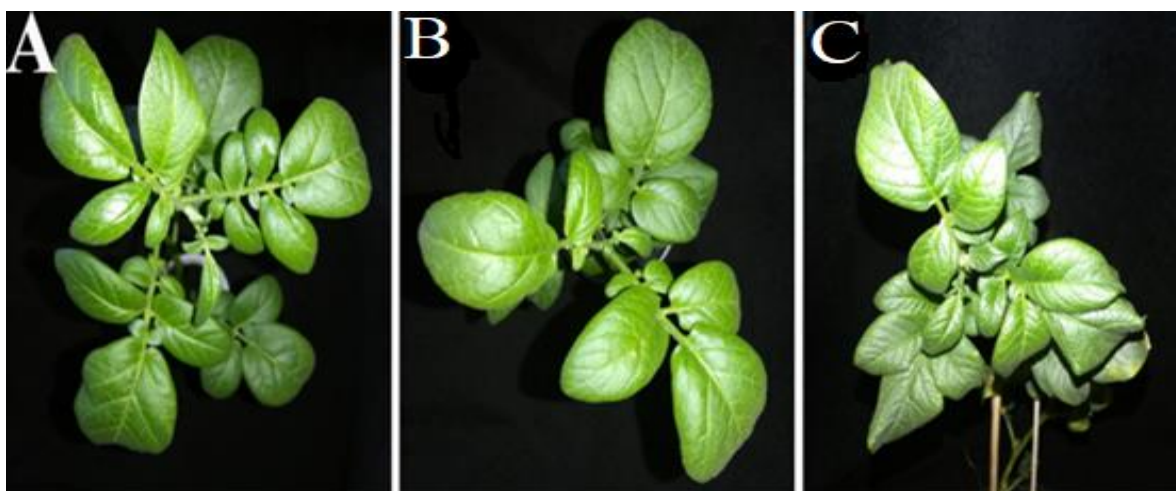


Рис 3.13 Симптоми, викликані PVY на листках рослин картоплі сорту Лугівська; А – трансгенна рослина з геном *ZRNase II*, інокульована буфером; В — трансгенна рослина з геном *ZRNase II*, інокульована PVY; С – рослина дикого типу, інокульована PVY



Рис 3.14 Симптоми, викликані PVY на листках рослин картоплі сорту Лугівська; А – трансгенна рослина з геном *bov*, інокульована буфером; В – трансгенна рослина з геном *bov*, інокульована PVY; С – рослина дикого типу, інокульована PVY

Після інокуляції PVY нетрансгенні рослини трьох сортів картоплі продемонстрували різний ступінь розвитку симптомів. Симптоми вірусної інфекції на контрольних рослинах картоплі варіювали від найбільш виражених для сорту Ласунак до м'яких для сорту Слов'янка. Була показана різниця стійкості сортів до вірусу. Хоча сорт Слов'янка відноситься до вірусостійких, однак, після інокуляції у цих рослин спостерігалися характерні симптоми, такі як жовті хлоротичні плями, некрози на нижніх листках, некроз стебел і жилок, концентричні некрози на листках, затримка росту. Однак розвиток симптомів в даного сорту був відтермінований у часі і починався на тиждень пізніше, ніж в інших сортах.

Аналізуючи розвиток симптоматичної картини у трансгенних рослин виявлено, що у трансгенних рослинах прояви вірусної хвороби були менші порівняно з рослинами дикого типу.

Трансгенні рослини Ласунак з геном *ZRNase II*, інокульовані PVY, продемонстрували відстрочені та менш виражені симптоми вірусної інфекції. Симптоми вірусної інфекції були відсутні у рослин сорту

Лугівська з геном *ZRNase II*. На 25-30 день після зараження з'являлися перші хлоротичні плями на верхніх листках рослин.

Рослини сорту Лугівська з геном *bov* мали ознаки хлорозу і скручування листя. Аналогічна ситуація була і у рослин сорту Ласунак з геном *bov*, спостерігали жовті плями та некроз на листках. Розвиток цих симптомів спостерігали на два тижні пізніше, ніж в контрольних рослинах відповідних сортів. Рослини сорту Ласунак з геном *bov* були більш чутливими до інфекції PVY, ніж рослини сорту Лугівська з тим же геном, демонструючи, що природна стійкість сорту в поєднанні з впливом гетерологічної РНКазиди відіграє важливу роль у загальній резистентності до вірусу.

Візуальну діагностику не можна вважати надійним та ефективним методом детекції вірусів, оскільки прояви вірусної інфекції, за своїми ознаками можуть співпадати з проявами бактеріальних хвороб або змінами, викликаними абіотичними факторами, нестачею поживних речовин тощо. Для достовірного підтвердження ураження рослин було проведено імуноферментний аналіз (ІФА).

3.2.5 Імуноферментний аналіз інфікованих рослин *S. tuberosum*

Для визначення антигенів PVY в рослинах картоплі був обраний варіант ІФА в модифікації подвійного сендвічу (DAS-ELISA). Для проведення аналізу відбирали верхні листки другого ярусу. Зразки вважали позитивними, якщо значення поглинання ОД при довжині хвилі 405 нм перевищувало середнє значення вільних від вірусів лунок принаймні в два рази.

Згідно з результатами аналізу ІФА, спостерігали різні рівні накопичення антигена. Результати аналізу представлені на рисунку 3.15

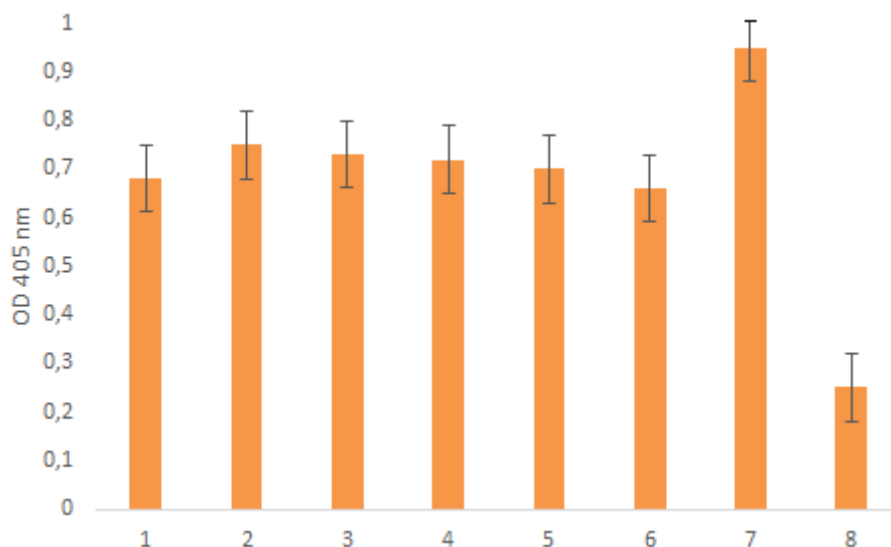


Рис. 3.15 Результати сендвіч ІФА екстрактів рослин *S. tuberosum*.

1, 2, 4 – інфіковані рослини сортів Слов’янка, Ласунак та Лугівська, відповідно 3, 5 – інфіковані трансгенні рослини сортів Ласунак та Лугівська з геном *bov*; 6 – інфікована трансгенна рослина сорту Лугівська з геном *ZRNase II*; 7 – позитивний вірусний контроль; 8 – негативний контроль

Виявлено дещо нижчий рівень накопичення антигенів PVY у рослинах сорту Слов’янка порівняно з іншими представленими сортами. Отримані дані співвідносяться з заявленими сортовими характеристиками стійкості до вірусів. Рослини дикого типу сорту Ласунак накопичували найвищий рівень PVY серед усіх досліджуваних сортів рослин, хоча оригінатори стверджують, що даний сорт має відносно високу стійкість до вірусних хвороб картоплі.

Аналіз результатів показав, що не було різниці у накопиченні вірусного антигена в контрольних рослинах сортів Лугівська та Ласунак та трансгенних рослин відповідних сортів з генами *bov*. У той же час у трансгенних рослин сорту Лугівська з геном *ZRNase II* рівень накопичення вірусу був найнижчим серед усіх досліджуваних трансгенних рослин.

Спостерігали тенденцію до нижчого накопичення антигенів в трансгенних рослинах, проте різниця не була достовірною.

На основі цих даних було зроблено висновок, що ген *bov*, мав менший вплив на накопичення вірусного антигена в рослинах. В свою чергу накопичення PVY зменшувалося в трансгенних рослинах, які містили в своєму геномі ген *ZRNase II*. Отже, можна припустити, що використання гена рибонуклеази рослинного походження є більш доцільним для створення вірусостійких рослин, ніж використання гена *bov*.

Таким чином, в результаті проведеного комплексного дослідження рослин *S. tuberosum* було показано, що, незважаючи на тривале підтримання рослин в колекції трансгенних рослин інституту, в цих рослинах зберігалися цільові гени. В досліджуваних рослинах була відмічена підвищена загальна РНКазна активність у порівнянні з вихідними рослинами дикого типу відповідних сортів. Симптоматична картина в інфікованих PVY рослинах варіювала. Різний перебіг розвитку вірусної інфекції є свідченням можливості використання генів рибонуклеаз для створення рослин зі зміненою вірусостійкістю.

Порівнюючи отриманні дані з результатами подібних досліджень, було виявлено [144, 145], що в рослинах тютюну трансформованих генами *bov* і *ZRNase II* також спостерігали затримку розвитку симптомів викликаних TMV, однак не спостерігалось значних відмінностей між рослинами, які мали різні перенесені гени. Нажаль, публікації з досліджуваними генами вкрай мало. Однак, можна провести паралелі з іншими використаними генами РНКаз. Так, введення РНКаз *pac1* у рослини *Impatiens walleriana* забезпечило стійкість до вірусу TSWV, у той час як трансгенні лінії *N. tabacum* показали ознаки резистентності або підвищену толерантність до TSWV [85]. Результати [155] показали, що

надмірна експресія гетерологічного гена, що кодує РНКазу *rac1* у трансгенній сої, підвищила її множинну стійкість до вірусів. Автори вважають, що *rac1* забезпечував контроль проти ряду РНК-вірусів. Однак, трансгенні лінії сої, що мали ген *rac1*, також не були повністю захищені від вірусних інфекцій. Автори висловили припущення, що це явище пов'язане з дозозалежним ефектом резистентності, опосередкованої дії *rac1*. Було показано, що експресія гетерологічної РНКазы може контролювати велику кількість вірусів [155]. Вважається, що введення генів РНКазы захищає рослини не лише від різноманітних вірусів, а й від віроїдів [29, 94]. Кілька віроїдів поширені у всьому світі, класифіковані як карантинні патогени, отже, існує нагальна потреба в розробці надійних антивірусних стратегій.

Висновок до розділу 3.2 В результаті досліджень встановлено, що у трансгенних рослинах *S. tuberosum* була підвищена загальна РНКазна активність. Після інфікування PVY в трансгенних рослинах вираженість симптомів була меншою, ніж у рослин дикого типу. Окрім того, в трансгенних рослинах спостерігали затримку розвитку інфекційного процесу. Незважаючи на дані відмінності, в трансгенних рослинах не відбувалася повна елімінація вірусу, що було підтверджено методом ІФА. Встановлено, що як за тяжкістю симптомів, так і за кількістю накопиченого антигена трансгенні рослини з геном *bov* були менш стійкими, ніж рослини з геном *ZRNase II*. Таким чином, наступним етапом було дослідження ефективності використання гена *ZRNase II* для рослин іншого виду.

Власні дослідження цього розділу представлені в **Potrokhov A, Sosnovska D, Ovcharenko O, Budzanivska I, Rudas V, Kuchuk M. Increased ribonuclease activity in *Solanum tuberosum* L. transformed with heterologous genes of**

apoplastic ribonucleases as a putative approach for production of virus resistant plants. *Turk J Biol.* 2021. 45(1). P. 79-87. doi: 10.3906/biy-2007-87

РОЗДІЛ 3.3 Дослідження трансгенних рослин *Petunia*×*hybrida*

Трансформовані сорти рослин *Petunia*×*hybrida* були депоновані в колекції інституту з 2019 року. В колекції були представлені лінії сортів М1 та Р5, що містили в своєму геномі цільовий ген *ZRNase II*. Перед початком досліджень необхідно було впевнитися тому, що в цих рослинах зберігався цільовий ген. Для цього проводили молекулярно-біологічний аналіз.

3.3.1 Молекулярно-біологічний аналіз рослин *Petunia*×*hybrida*

Для визначення наявності конституційної вставки гена *ZRNase II* проводили ПЛР аналіз. Проведений молекулярно біологічний аналіз, показав наявність вставки в чотирьох лініях гібриду Р5 та двох лініях, гібриду М1 (рисунок 3.16). Ліній отримали маркування Т. Однак, в подальшому через незадовільні ростові характеристики однієї з ліній гібриду Р5 від неї вирішено було відмовитися.

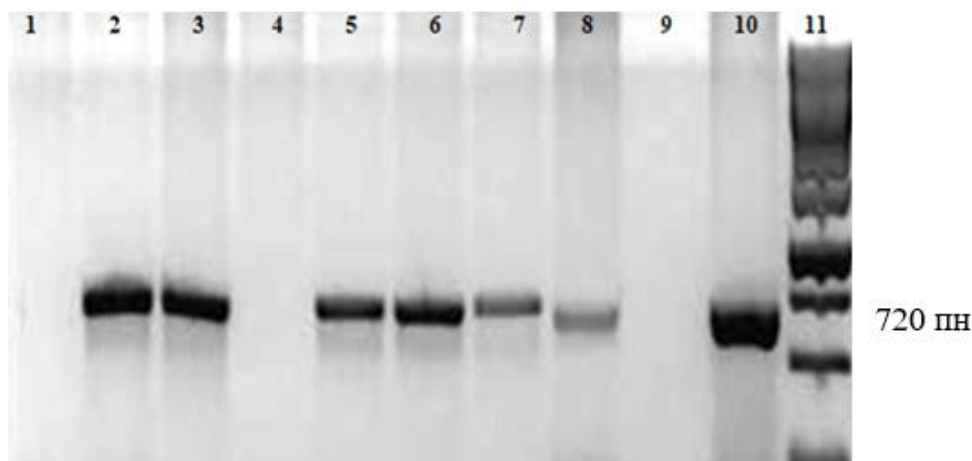


Рис 3.16 Електрофореграма продуктів ПЛР з праймерами, специфічними до гена *ZRNase II* в рослинах *Petunia*×*hybrida*;

1– нетрансгенна рослина M1; 2, 3 – трансгенні лінії M1; 4 – нетрансгенна рослина P5; 5-8 – трансгенні лінії P5; 9 – негативний контроль, без ДНК; 10 – позитивний контроль, плазмідна ДНК; 11 – маркер молекулярної маси Scientific GeneRuler 1 kb, 250–10000 bp

Таким чином, перевірка колекційних зразків рослини *Petunia*×*hybrida* підтвердила наявність конституційної вставки гена *ZRNase II* в досліджуваних зразках.

Щоб впевнитися у відсутності явища мовчання генів, було відібрано рослини для проведення зворотно транскрипційного аналізу, пов'язаного з полімеразно ланцюговою реакцією (ЗТ-ПЛР). Для дослідження активності транскриптів було відібрано по дві лінії кожного сорту (рисунок 3.17).

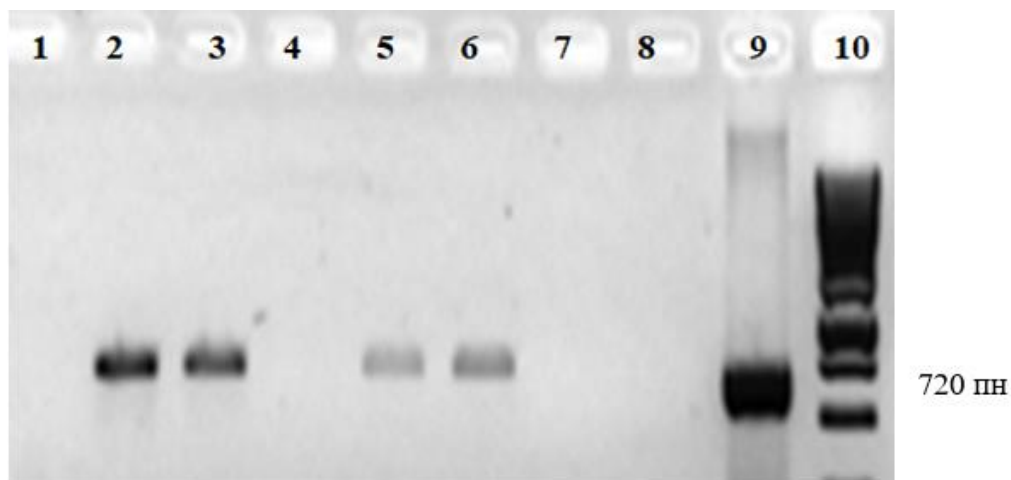


Рис. 3.17 Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР з праймерами специфічними до гена *ZRNase II* в листі рослин *Petunia*×*hybrida*;

1 – дикий тип M1; 2-3– трансгенні лінії M1; 4 – дикий тип P5; 5, 6 – трансгенні лінії P5; 7 – суміш реагентів без додавання кДНК; 8 – суміш реагентів без додавання РНК; 9 – плазмідна ДНК; 10 – ДНК-маркер (Thermo Scientific GeneRuler 1 kb, 250 –10000 bp)

Показано, що в проаналізованих рослинах, що всі дослідні зразки мали в своєму геномі активний ген *ZRNase II*, що свідчило про відсутність явища мовчання генів.

3.3.2 Адаптація *Petunia*×*hybrida* до тепличних умов та їх вирощування

Як зазначалося в раніше, процес адаптації до тепличних умов є одним з критичних моментів. В результаті роботи було встановлено алгоритм оптимальної адаптаційної схеми, який був застосований для рослин петунії, а в подальшому був використаний для рослин тютюну.

Рослини петуній адаптували за наступної схемою. На агаризованому середовищі рослини дорощували до 10 см. Для створення вологого мікроклімату рослини висаджували в 36 лункові мікроплати з субстратом TS1, накриваючи кришкою, утворюючи мікропарник. Через місяць

культивування рослин кришку знімали. Після цього рослини пересаджували в горщики Р9. Через два місяці рослини були повністю адаптовані та готові до подальших досліджень (рисунок 3.18).



Рис 3.18 Двостадійна адаптація на прикладі рослин *Petunia*×*hybrida*.

Ефективність акліматизації склала 85-90%.

В процесі акліматизації були виявлені зовнішні ростові і візуальні відмінності в сортах петунії. Сорт М1 мав схильність до утворення довгих повзучих стебел з відносно невеликим листям та формував фіолетово-білі двокольорові квіти. Сорт Р5 мав більше листя, його стебла не проявляли тенденцію до видовження, а квіти були однотонні, махрові, насиченого фіолетового кольору (рисунок 3.19).



Рис 3.19 Загальний вигляд сортів петунії М1 (а) і Р5 (б).

В результаті роботи були отримані здорові акліматизовані рослини, які були використані для подальших досліджень.

Перед інфікуванням рослин визначали загальну РНКазну активність.

3.3.3 Визначення РНКазної активності в трансформованих рослинах

Аналіз рослин петунії проводили за модифікованою методикою з додаванням орицину. Для аналізу РНКазної активності в рослинах петунії використовували вихідні рослини сортів М1 та Р5 та їх трансгенні лінії з геном ZRNase II (рисунок 3.20)

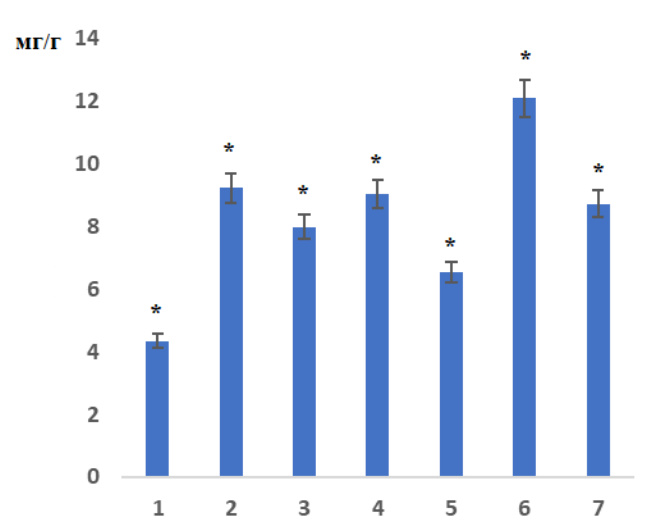


Рис. 3.20 Загальна активність РНКаз в екстрактах листя *Petunia*×*hybrida*; 1, 5 – контрольні нетрансформовані рослини P5 та M1, відповідно; 2-4 – трансгенні лінії сорту P5; 6-7 – трансгенні лінії сорту M1 *P ≤ 0,05

Загальна РНКазна активність у трансгенних рослин перевищувала показники активності у рослин дикого типу. В лініях сорту P5 активність була в 1,83-2,10 вища, ніж у рослинах дикого типу. Загальна РНКазна активність в трансгенних лініях сорту M1 була в 1,34-1,85 рази вищою, ніж у рослин дикого типу.

Аналізуючи результати у проведених експериментах інших дослідників встановлено, що рослини тютюну з геном *ZRNase II* характеризувались високою РНКазною активністю, що була в 1,6 – 3,5 разів вища ніж у контролі [123, 144]. Автори цих досліджень пояснюють такий ефект використання різних регуляторних генів у використаних векторних конструкціях. Також, дослідження з рослинами картоплі з геном *ZRNase II* показали, що загальна РНКазна активність була 1,2 рази вища порівняно з нетрансгенними рослинами [104]. Активність сумарних РНКаз була помірно підвищена, однак трансгенні рослини добре перенесли інокуляцію високою концентрацією вірусом, на відміну від нетрансгенних.

Отримані дані корелюють з тим фактом, що білки PR-4, продукти гена L3 з *Capsicum chinense*, які мали одночасно РНКазну та ДНКазну активність, захищали рослини від більшості тобамовірусів незважаючи на дуже низький внесок до основної активності нуклеаз в інфікованих рослинах [48].

Після визначення загальної РНКазної активності рослини петунії були інфіковані TMV.

3.3.4 Ураження рослин *Petunia*×*hybrida* та підтвердження ураження

Для інфікування рослин використовували нативний препарат TMV у концентрації 250 мкг/мл. Зразок TMV був отриманий зі зразків кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Для інфікування верхні листки дослідних рослин інокулювали TMV шляхом втирання суспензії вірусомісного препарату. Як додатковий контроль використовували рослини інокульовані фосфатним буфером без вірусу.

Після інокуляції проводили візуальну оцінку ознаки розвитку вірусної інфекції. На третій тиждень після інокуляції на верхніх листках рослин дикого типу спостерігали ознаки вірусного ураження: мозаїку на листі, крапчастість, деформація листкових пластинок.

Симптоматична картина відрізнялася в залежності від сорту. Листя сорту M1 мали виражені симптоми інфекції. В той же час листя сорту P5 не виявили яскравих ознак вірусної інфекції. Основними симптоматичними проявами вірусу в даному сорті була незначна деформація листя. Рослини, в яких було імітоване вірусне ураження, ознаки інфекції не детектували. Симптоми вірусної інфекції зображені на рисунку 3.21.



Рис 3.21 Візуальні ознаки TMV в рослинах *Petunia*×*hybrida*. Відокремлені листки петунії. а, б – сорт М1 не інфікований та б – інфікований, відповідно с – інфікована трансгенна рослина сорту М1. Розвиток симптомів вірусної інфекції на інфікованих контрольних нетрансформованих рослинах петунії М1 (d) та трансгенних рослинах М1 (e)

В трансгенних рослинах спостерігали затримку розвитку вірусної інфекції незалежно від сорту рослин.

З літературних даних відомо, що симптоматична картина, викликана тобамовірусами, в природно заражених рослинах петунії зазвичай починає з'являтися з другого тижня після інфікування і може залежати від гібриду [26]. В заражених рослинах симптоми можуть коливатися від їх повної відсутності, так і різних за ступенем тяжкості форм плямистості, мозаїки, деформації листя. Інфекція також може зменшити кількість квітів, їх розмір, а також ставати причиною зміни забарвлення [26].

Як вже зазначалося, візуальна діагностика не може вважатися надійним ефективним методом детекції вірусів, тому для достовірного підтвердження ураження рослин було використано метод імуноферментного аналізу.

3.3.5 Імуноферментний аналіз уражених рослин *Petunia*×*hybrida*

Для аналізу петуній був використаний варіант непрямого ІФА. В якості первинних антитіл використовували поліклональні кролячі антитіла до TMV, вторинними антитілами були козячі антикролячі антитіла комерційного виробництва фірми «Sigma», які використовували відповідно до інструкцій виробника. Для проведення аналізу відбирали верхні листки другого ярусу рослин з ознаками вірусного ураження. Позитивним результатом вважали значення поглинання ОД при довжині хвилі 405 нм яке перевищувало середнє значення вільних від вірусів зразків принаймні в два рази. Результати аналізу представлені на рисунку 3.22.

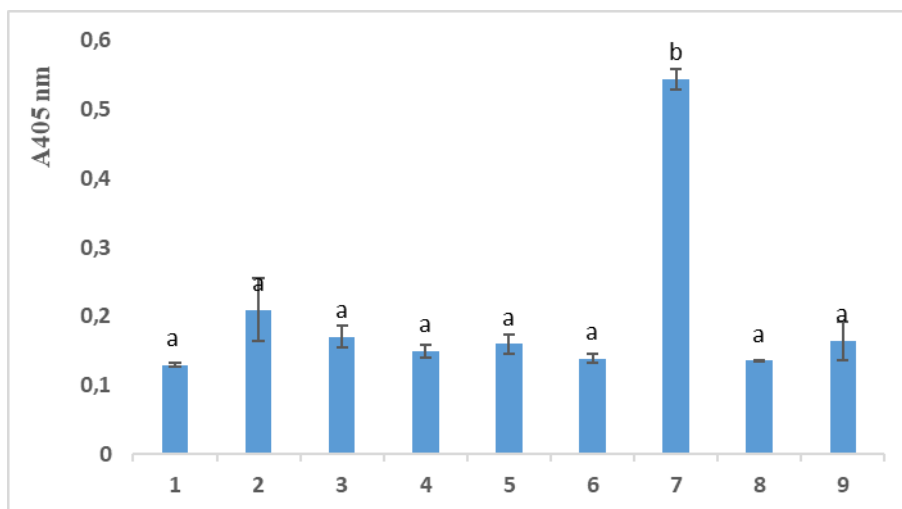


Рис. 3.22 Результати непрямого ІФА екстрактів рослин *Petunia*×*hybrida*. 1, 6 – інокульовані буфером рослини дикого типу сортів Р5 та М1 відповідно; 2, 7 – інокульовані ТМВ рослини дикого типу сортів Р5 та М1, відповідно; 3-5 – інокульовані ТМВ трансформовані лінії петунії сорту Р5; 8-9 – трансформовані лінії петунії сорту М1. Однаковими літерами позначені стовпчики без істотних відмінностей

Виявлено, що у рослин дикого типу сорту М1 вміст вірусного антигена був майже в 4 рази вищий, ніж у трансгенних лініях даного сорту. У вихідних рослин сорту Р5 (де спостерігали незначні ознаки вірусної інфекції) різниця накопичення вірусного антигена була також вищою порівняно з трансгенними лініями. Порівнюючи між собою дані, отримані з вихідних сортів, з'ясовано, що значення поглинання інфікованих зразків М1 перевищували відповідні значення інфікованих рослин Р5 у 2,6 рази.

Результати аналізу екстрактів трансгенних рослин показали, що інфіковані трансгенні рослини сорту М1 мали нижчі рівні накопичення вірусного антигена, ніж інфіковані рослини дикого типу даного сорту. Різниця складала 3,3 – 4,0 рази. Показники рівня антигенів в інфікованих трансгенних

рослин сорту P5 порівняно з контрольними рослинами цього сорту становили 1,15–1,32 та 0,98–1,19.

Результат проведених досліджень показав високу ефективність використання гена *ZRNase II* для створення вірусостійких рослин.

В подібних дослідженнях при використанні інокуляту TMV [144] було показано, що розвиток симптомів в трансгенних рослинах тютюну з геном *ZRNase II* залежав від концентрації вірусу. У випадку низьких (0,01 мкг/мл) або середніх (0,1 мкг/мл) концентрації розвиток вірусних симптомів у трансгенних рослинах був відсутній. При збільшенні концентрації до 10 мкг/мл через 3 тижні після інокуляції відмінності між зараженим контролем і трансформованим рослини були менш помітними.

3.3.6 Оцінка розвитку стресових реакцій у рослин *Petunia*×*hybrida*

Рослини петунії були дослідженні на предмет їх стійкості до стресових умов, викликаних біотичним фітовірусною інфекцією. В дослідженнях використовували лінії M1T1, M1T2, P5T1, P5T2, P5T3 та рослини дикого типу відповідних сортів. Аналізи проводили як для групи інфікованих рослин, так і рослин, які не були інфіковані.

Відомо, що постійні зміни умов навколишнього середовища викликають розвиток стрес-реакцій в рослинах. За умов помірної інтенсивності та тимчасової дії стресового чинника відбувається активізації захисних систем та мобілізація енергетичних ресурсів. Однак, якщо стресове навантаження має довготривалу дію, в клітинах активізуються ПОЛ та відбувається зниження синтезу білка. В умовах надмірного стресового навантаження відбувається балансування між АОА та ПОЛ. Проміжні продукти окислення можуть слугувати індукторами та медіаторами стресового стану [30, 149]. Вірусна інфекція може призводити до патологічних змін в організмі рослини та розвитку стрес-реакцій.

Для оцінки розвитку стрес-реакцій у трансгенних рослинах визначали показники накопичення продуктів ПОЛ та АОА через один місяць після інфікування. Одночасно з інфікованими рослинами досліджували іншу групу трансгенних рослин, які не зазнавали впливу вірусної інфекції.

Дослідження ПОЛ проводили за показниками ДК (початковий продукт реакції) та МД (кінцевий продукт реакції).

Вміст ДК у екстрактах рослин які не зазнавали впливу інфекції становив 0,25–0,30 мкгМ/мг, достовірної різниці між трансгенними рослинами і рослинами дикого типу виявлено не було. Однак, в окремих лініях, а саме МТ1 та Р5Т2, рівень накопичення ДК був значно вищий, та становив 0,4–0,45 мкгМ/мг (рисунок 3.23).

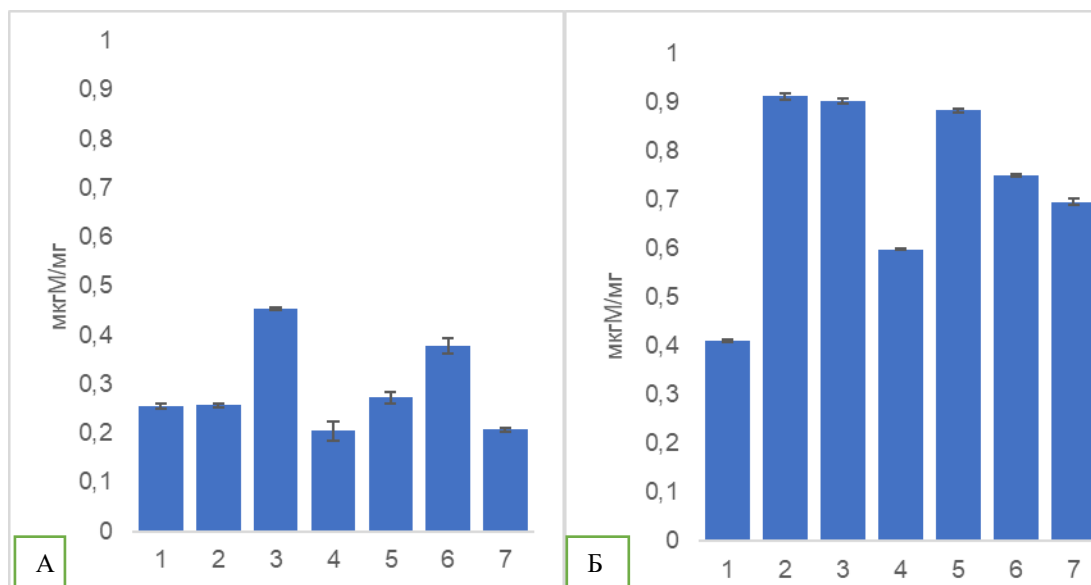


Рис. 3.23 Вміст ДК в неінфікованих (А) та інфікованих (Б) рослинах *Petunia x hybrida*; 1, 5 – нетрансформовані контрольні рослини сорту Р5 та М1, відповідно; 2-4 – трансгенні лінії сорту Р5; 6-7 – трансгенні лінії сорту М1

В той же час в групі рослин, які були інфіковані ТМV, вміст ДК як в трансгенних лініях, так і у вихідних рослинах підвищувався порівняно з не інфікованими рослинами. Після інфікування в трансгенних лініях Р5Т1 та Р5Т2

вміст ДК підвищувався в 2,2 разів порівняно з інфікованим контролем даного сорту. В той же час відмінності у рівні накопичення ДК між зараженими трансгенними лініями сорту М1 демонстрували 1.5 рази меншу відмінність порівняно з зараженими не трансгенними рослинами.

У трансформованих не заражених рослинах, за виключенням двох ліній, активність ПОЛ була на рівні контрольних не заражених не трансгенних рослин. В інфікованих контрольних рослинах дикого типу вірусна інфекція спричинювала активізацію процесів ПОЛ. Дане підвищення є сигналом активного розвитку стрес-реакції. У трансгенних інфікованих рослинах вміст ДК підвищувався порівняно з інфікованими нетрансгенними рослинами.

При дослідженні накопичення МД у екстрактах рослинах було показано, що в інфікованих трансформованих рослин вміст МД був вищим у порівнянні з вихідними рослинами дикого типу (рисунок 3.24).

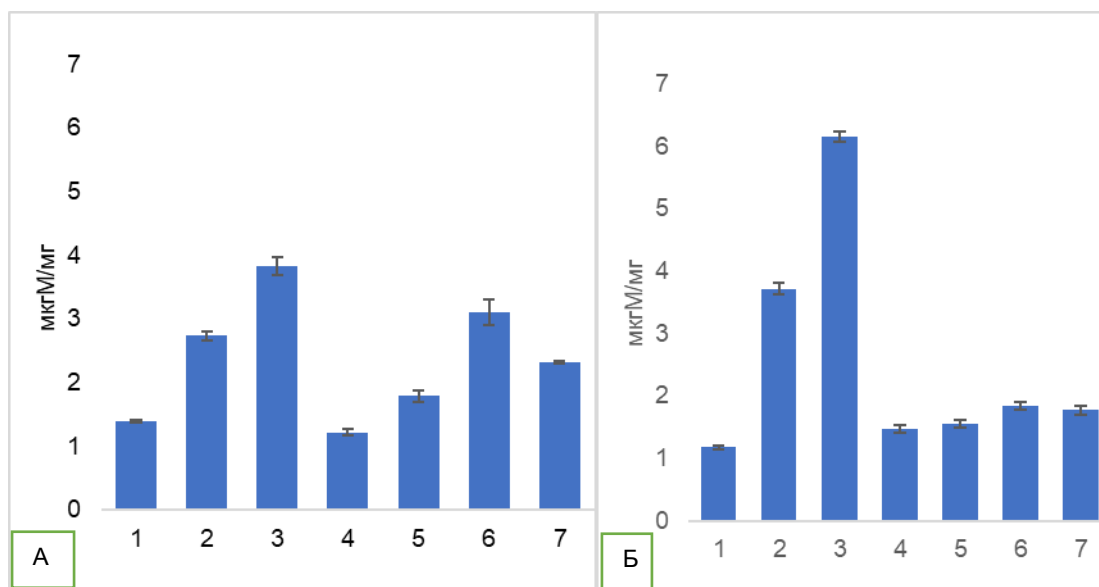


Рис. 3.24 Вміст МД в неінфікованих (А) та інфікованих (Б) рослинах *Petunia x hybrida*; 1, 5 – нетрансформовані контрольні рослини сорту Р5 та М1, відповідно; 2-4 – трансгенні лінії сорту Р5; 6-7 – трансгенні лінії сорту М1

Після інфікування TMV у трансгенних лініях сорту М1 вміст МД знижувався порівняно з показниками аналогічних ліній в групі неінфікованих рослин. Достовірної різниці у кількості МД у інфікованих трансгенних та нетрансгенних рослинах М1 виявлено не було. В трансгенних лініях сорту Р5 (Р5Т1, Р5Т2) вміст МД при інфікуванні перевищував, показники нетрансгенних інфікованих рослин 3-4 рази. В той же час, в лінії Р5Т3 накопичувалася найменша кількість МД порівняно з іншими трансгенними лініями.

Дослідження антиоксидантної активності в екстрактах петуній проводили шляхом визначення залишкового малону, який утворювався в процесі реакції з 2-дезоксирибози. При високій АОА відбувається деградація малону. Було показано, що до інфікування контрольні рослини мали відносно високу АОА, яка складала 9,5 мкМоль/г. В листових екстрактах трансгенних рослин Р5Т1 та М1Т1 спостерігали меншу АОА, близько 23,4-25,4 мкМД/г. Інші трансгенні ліній мали активність на рівні 12,0-13,3 мкМД/г. Дані представлені на рисунку 3.25.

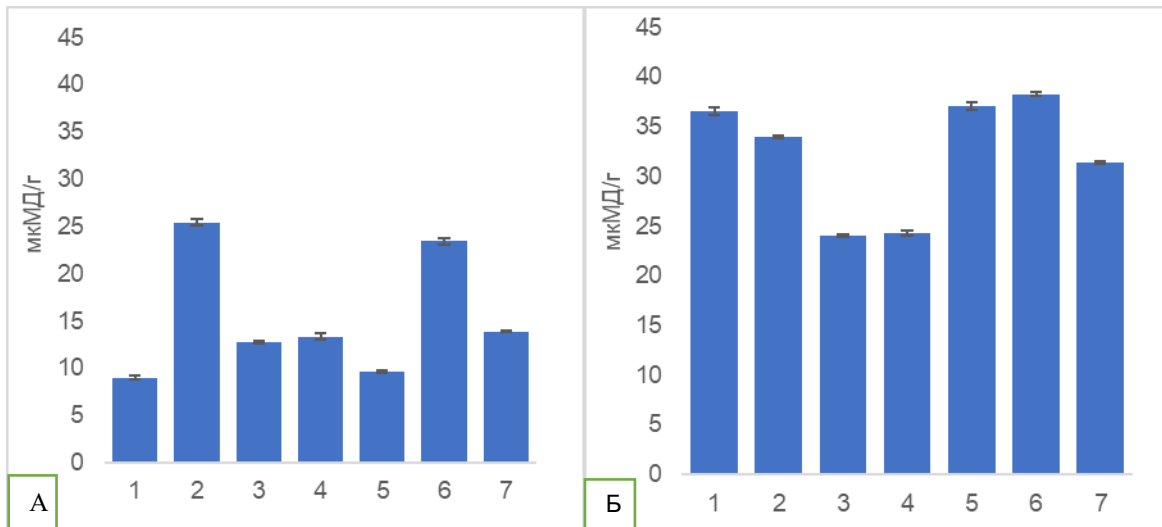


Рис. 3.25 АОА в неінфікованих (А) та інфікованих (Б) рослинах *Petunia×hybrida*; 1, 5 – нетрансформовані контрольні рослини сорту Р5 та М1, відповідно; 2-4 – трансгенні лінії сорту Р5; 6-7 – трансгенні лінії сорту М1

Водночас в групі рослин, які були інфіковані ТМV, спостерігали зниження АОА до 4 разів. В трансгенних інфікованих рослинах сорту Р5, усі рослини виявляли вищу АОА порівняно з контролем. Різниця між лініями Р5Т2, Р5Т3 та нетрансгенними рослинами становила 30%. В трансгенних лініях М1Т1 вона наближалась до контрольних значень, а у лінії М1Т2 АОА була більшою на 18%, ніж у контролі.

Відомо [9, 98, 105], що висока АОА є ознакою підвищеної стійкості до стресу, а отже, як наслідок, і більшої життєздатністю. Досліджувані трансгенні рослини відрізнялись від рослин дикого типу вищим рівнем АОА, що є свідченням їх підвищеної здатності до адаптації у відповідь на розвиток стресу. В результаті комплексного дослідження було встановлено, що трансгенні лінії відрізняються за показниками ПОЛ та АОА від нетрансгенних ліній та між собою. При інфікуванні частина трансгенних ліній перевищували нетрансгенні за адаптаційними характеристиками, що може бути пов'язано з ефективною експресією гена *ZRNase II*, яка сприяє

зменшенню вірусного навантаження в певних лініях трансгенних рослин. Лінії P5T3 та M1T2 становлять найбільший інтерес для подальших досліджень, оскільки показали найвищі адаптаційні характеристики при інфікуванні TMV.

Висновки до розділу 3.3 В трансгенних рослинах *Petunia*×*hybrida* з геном *ZRNase II* незважаючи на підвищену загальну РНКазну активність не відбувалася повна елімінація вірусу. Однак, такі рослини мали менш виражені візуальні ознаки інфекції та накопичували меншу кількість вірусного антигена. Окрім того, ці рослини проявляли тенденцію до підвищення адаптивної спроможності проти біотичного стресу, викликаного вірусом.

Подальші дослідження були направлені на вивчення системної вірусної реакції в рослинах з геном з *ZRNase II*. Однак, наявні сорти петунії не проявляли чіткої системної реакції, тому було вирішено розробити спеціальну модельну систему на основі рослин *Nicotiana benthamiana*. Ці рослини є універсальним об'єктом для вірусологічних досліджень.

Результати даного розділу представлені в роботах:

Ovcharenko O., **Potrokhov A.**, Sosnovska D., Hoysyuk Y, Yaroshko O, Shevchenko T, Budzanivska I., Rudas V., Kuchuk M. Increased virus resistance in transgenic petunia with heterologous *ZRNase II* gene. *Jordan Journal of Biological Sciences*. 2023. 16(4). P. 587 – 592. <https://doi.org/10.54319/jjbs/160403>

Потрохов А.О., Сосновська Д.І., Овчаренко О.О. Антиоксидантна активність петуній із геном гетерологічної рибонуклеази *ZRNase II*, інфікованих вірусом тютюнової мозаїки. *Innov Biosyst Bioeng*. 2022. 6(1). С. 40–45. doi: 10.20535/ibb.2022.6.1.254464

РОЗДІЛ 3.4 Дослідження трансгенних рослин *Nicotiana benthamiana*

Рослини *N. benthamiana* в роботі використовували для дослідження системної вірусної реакції в трансгенних рослинах з геном *ZRNase II*.

3.4.1 Уведення в культуру *in vitro* рослин *N. benthamiana* та їх субкультивування

Перед початком роботи рослини *N. benthamiana* необхідно було вести у культуру *in vitro*. Для цього шляхом поверхневої стерилізації було оброблене насіння рослин. Насіння пророщували на середовищі MS. Використана комбінація стерилізуючих агентів була ефективна для знезараження насіння та в одно час не впливала на його проростання та життєздатність. Насіння проростало на 3-4 день після стерилізації, його схожість склала 100%. Через тиждень після проростання пророщені пагони відокремлювали та переносили на агаризоване середовище $\frac{1}{2}$ MS для укорінення (рисунок 3.26). Через місяць після початку культивування спостерігали формування коренів. Субкультивування рослин проводили шляхом субкультивування кожні три тижні. Відокремленні пагони вирощували в чашках Петрі на агаризованому безгормональному $\frac{1}{2}$ MS в культиваційній кімнаті при 16-годинному режимі освітлення та температурі +26°C.

Таким чином, застосований спосіб поверхневої стерилізації дозволив ефективно провести знезараження насінневого матеріалу та увести рослини в культуру *in vitro*.



Рис. 3.26 Уведені в культуру *in vitro* в рослини *N. benthamiana*.

Отриманий рослинний матеріал був використаний для подальших досліджень.

Перед початком експериментів по трансформації рослин було визначено селективну концентрацію антибіотика канаміцина, який виступав селективним агентом.

Для визначенні селективної концентрації було використане базове середовище MS з додаванням антибіотика канаміцина у концентраціях 25 мг/дм³, 50 мг/дм³ та 100 мг/дм³ (рисунок 3.28).

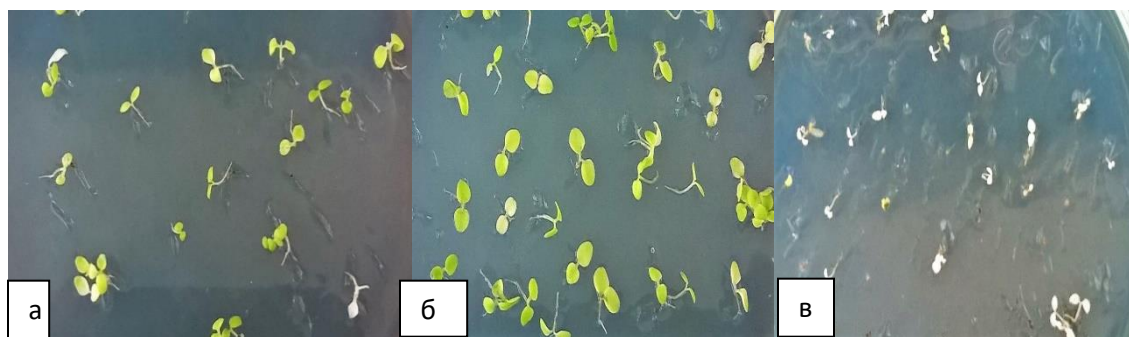


Рис 3.28 Визначення селективної концентрації канаміцину:

а – 25 мг/дм³

б – 50 мг/дм³

в – 100 мг/дм³

Концентрації 25 та 50 мг/дм³ були недостатні, оскільки частина проростків залишалася живою, що в подальшому могло спотворювати результати селекції після трансформації. При додаванні в середовище MS канаміцину у концентрації 100 мг/дм³, відбулася повна втрата зеленого забарвлення. Концентрація при якій відбувається повна загибель усіх рослин вважається селективною. Таким чином, концентрацію 100 мг/дм³ канаміцину в подальшому використовували як селективну.

Використання селективних маркерів необхідне для відбору трансформованих рослин від нетрансформованих. В генетичних дослідженнях найчастіше застосовуються гени, що надають резистентність до антибіотиків [84]. В результаті їх використання відбувається візуальна селекція рослин. Також розробляються і інші методи селекції, зокрема з використанням генів ксилулозізомерази, фосфоманозізомерази, ізопентилтрансферази, [37], які стимулюють вихід фітогормонів, що спричинює зміну морфологічних ознак. Використання ефективних систем селекції дає змогу для швидкого відбору новоутворених трансформованих рослин.

В проведених в даній роботі дослідженнях використовували ген *npt II*, що обумовлює стійкості до антибіотика канаміцина. Використання цього гена дозволяє максимально ефективно відібрати трансгенні рослини, які в процесі, генетичної трансформації набувають стійкості до антибіотика.

3.4.2 Генетична трансформація рослин *N. benthamiana*

Листкові диски *N. benthamiana* трансформували штамом AGL0 *A. tumefaciens*, що містить вектор pBi-RNS. Т-ДНК вектора pBi-RNS включала ген *ZRNase II* S-подібної РНКазі *Zinnia elegans*, контрольований промотором p35S CaMV і ген *npt II*. Рослини регенерували та відбирали на

регенераційному середовищі MS з додаванням 100 мг/дм³ канаміцина та 400 мг/ дм³ цефотаксима.

На регенераційному агаризованому для рослин тютюну було притаманне утворення пагонів на вихідних експлантах зі 100% частотою (рисунок 3.29). Відокремлені від вихідних експлантів пагони переносили на селективне середовище для відбору трансформованих рослин.

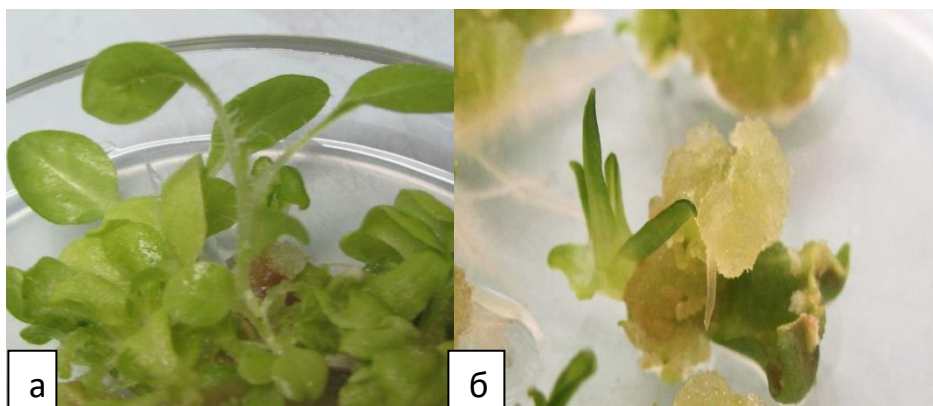


Рис. 3.29 Регенеровані пагони;

а – регенеровані рослини

б – регенерація рослин з калюсної культури.

Новоутворені рослини залишалися живими та не набували білого забарвлення, що є свідченням перенесення в їх геном селективного гена. Отримані рослини фенотипово не відрізнялися від контрольних рослин.

Після селектування рослин проводили ПЛР аналіз.

3.4.3 Проведення полімеразної ланцюгової реакції рослин *N. benthamiana*

Для ПЛР аналізу вибірково відбирали рослини новоутворені. В результаті проведеного ПЛР було викормлено чотири лінії рослин *N. benthamiana* (рисунок 3.30)

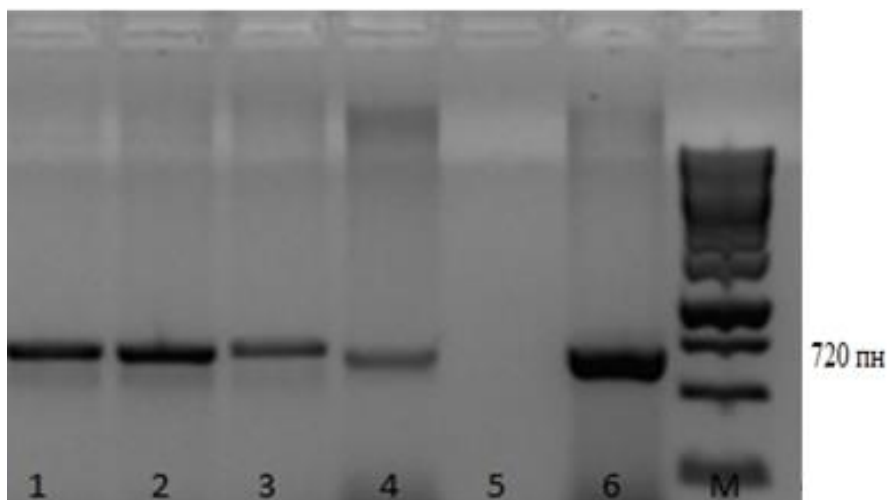


Рис 3.30 Електрофореграма продуктів ПЛР з праймерами специфічними до гена *ZRNase II* в рослинах *N. benthamiana*.

1-4 – трансгенні рослини *N. benthamiana*; 5 – не трансгенний контроль; 6 – плазмідна ДНК; М – молекулярний маркер GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Аналіз *N. benthamiana* показав, що у всіх досліджуваних зразках була наявна генетична вставка гена *ZRNase II*.

3.4.4 Адаптація *N. benthamiana* до тепличних умов та їх вирощування

Ефективність адаптації рослин *N. benthamiana* склала 90%. В результаті були отримані здорові рослини. Після адаптації рослин визначали загальну РНКазну активність в листі.

3.4.5 Визначення РНКазної активності в трансформованих рослинах *N. benthamiana*

Аналіз активності проводили аналогічно як і для рослин петунії.

При дослідженні РНКазної активності в рослинах *N. benthamiana* з геном *ZRNase II* було встановлено, що контрольні рослини мали значно вищий рівень активності (рисунок 3.31).

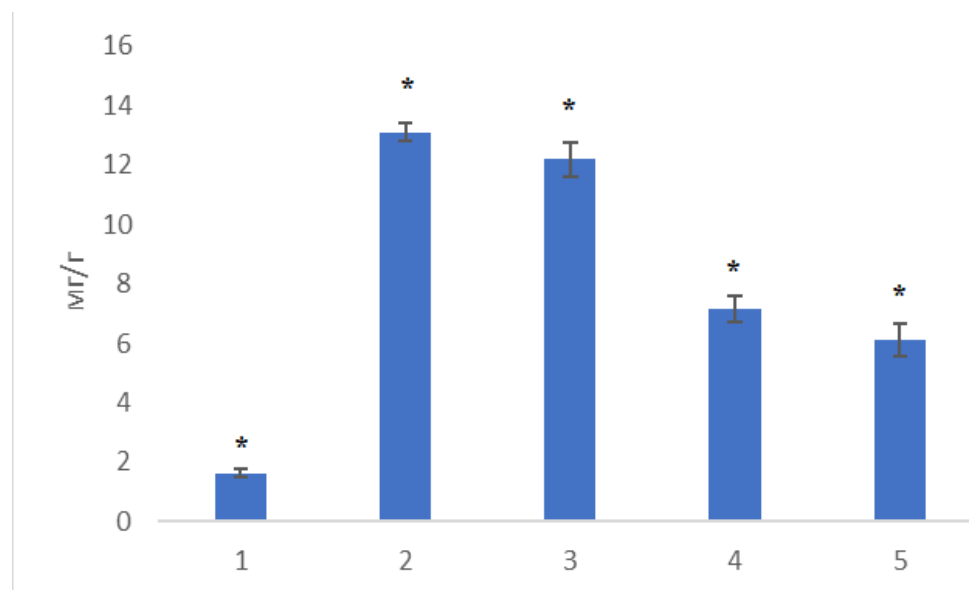


Рис.3.31 Загальна активність РНКаз в екстрактах листя *N. benthamiana*;

1 – контрольні рослини дикого типу; 2-5 – лінії з геном *ZRNase II* * $P \leq 0,05$

Виявлено, що в лініях №1 та №2 загальна РНКазна активність була в шість разів вищою ніж в контролі, а в лініях №3 і №4 активність була вищою в чотири рази. В результаті, було показано, що трансформація рослин *N. benthamiana* геном призводила до збільшення рівня активності РНКаз порівняно з рослинами дикого типу.

3.4.6 Опосередкована GFP візуалізація взаємодії вірус-рослина

Модельна система вірус-рослина, представляла собою трансгенні рослини *N. benthamiana* з геном *ZRNase II*, які були інфільтровані агробактеріальною конструкцією, що містила в своєму складі елементи вірусу картоплі X та репортерний ген *gfp*. Продукт цього гена здатен флуоресцювати в ультрафіолетовому спектрі, що дозволяє візуально оцінити розповсюдження вірусу по рослині у реальному часі. Візуалізація отриманих результатів представлена на рисунку 3.32.

Встановлено, що світіння GFP спочатку з'являлося в зоні первинної інокуляції.

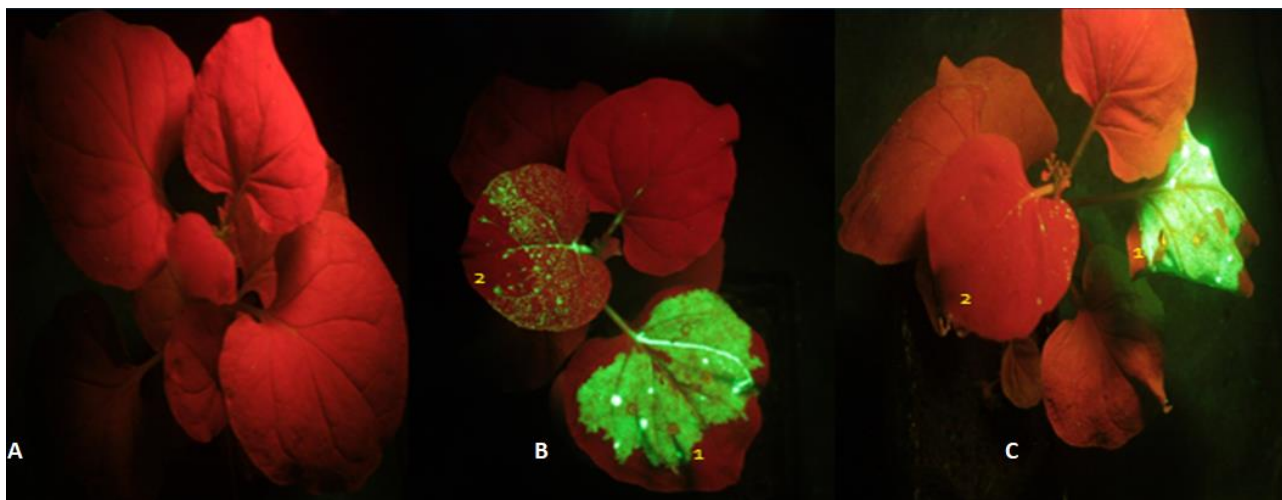


Рис 3.32 Флуоресценція GFP в рослинах *N. benthamiana* через 3 тижні після агроінфільтрації векторними конструкціями pICH 27566 та pICH 6692; Рослини дикого типу А – неінфікована, контроль, В – інфікована, контроль; С – інфікована рослина з геном *ZRNase II*.

1 – зона первинної інфільтрації; 2 – системна вірусна інфекція

Флуоресценція GFP дала змогу виявити, що в рослинах дикого типу системне поширення вірусних частинок спостерігалось на другий тиждень після інфікування. Розповсюдження вірусних часток відмічали за характерним свіченням GFP. Вірусні частки спостерігали в сайтах відмінних від зони первинної інокуляції. В подальшому GFP був детектований в молодих листках, судинних пучках, зокрема в центральних та бічних жилках пагонів.

Відомо, що транспорт вірусів по рослині поділяють на локальний (транспорт від клітини до клітини) та системний (коли віруси досягають провідних систем рослини) [42, 127]. На швидкість поширення вірусу по рослині можуть впливати низка різних факторів від виду рослини до специфічних транспортних білків вірусів [42]. В залежності від видової

приналежності вірусу та рослини, системна вірусна реакція може проявлятися через два тижнів до декількох місяців після уражень [42, 51].

Встановлено, що в трансгенних лініях рослин розвиток системної вірусної реакції був змінений. Не заважаючи на високу РНКазну активність в трансгенних лініях №1 та №2 розвиток вірусної інфекції був слабо уповільненим. В трансгенній лінії №1 розвиток системної реакції спостерігали на 5-6 днів пізніше ніж в контролі. В цих рослинах GFP детектували в листі другого і третього ярусів відносно зони первинної інфільтрації. В трансгенній лінії №2 спостерігали флуоресценцію GFP в молодому листі першого ярусу на 7-9 день після прояву інфекції в рослинах дикого типу, а в листах другого та третього ярусу через 14-15 днів. Розвиток системної реакції найбільш помітно сповільнювався в рослинних лініях №3 та №4. Найбільш стійкою була лінія №3, де чітко виражену системну реакцію спостерігали лише через місяць після проявів інфекції в рослинах дикого типу. Таким чином було показано, що в трансгенних рослинах розвиток вірусної інфекції був уповільнений і залежав від лінії.

Ймовірною причиною того, що в рослинних лініях №1 та №2 при високих показниках загальної РНКазної активності, розвиток інфекції був слабо уповільненим може слугувати сигналом проходження складних молекулярно біологічних процесів пов'язаних з взаємодією перенесеного гена з рослинним геном.

3.4.7 Визначення співвідношення антоціанів до хлорофілів в трансгенних рослинах *N. benthamiana*

Використовуючи портативний прилад Opti-Sciences MPM-100 було проаналізовано вмісти хлорофілів, антоціанів та їх співвідношення після ураження. Можливості приладу не дозволяють аналізувати вміст хлорофілу

за його типом, а лише вимірюють його загальне значення в досліджуваному зразку. Аналіз результатів показав, що вміст хлорофілу підвищувався в усіх інфікованих рослинах в 1.5 рази. Підвищення вмісту хлорофілів було притаманне як для рослин дикого типу так і для трансгенних ліній (рисунок 3.33).

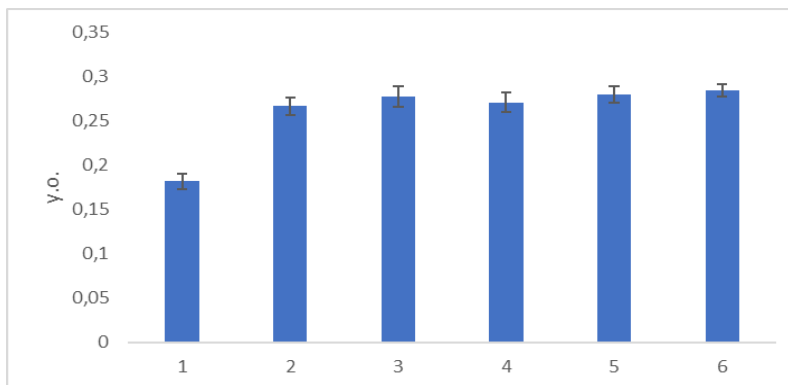


Рис.3.33 Вміст хлорофілів в рослинах *N. benthamiana* агроінфільтрації векторними конструкціями рІСН 27566 та рІСН 6692 1 – не інфіковані рослини дикого типу; 2 – інфіковані рослини дикого типу; 3-6 – трансгенні лінії *N. benthamiana*.

Підвищенням кількості хлорофілів є важливим показником активізації процесів пов'язані з розвитком вірусної реакції. В наслідок дії вірусу на організм рослини включаються захисні механізми, які пов'язанні зі зміною кількості хлорофілу. Зміна пігментного складу рослин, відбувається в наслідок поступової руйнації фотосинтетичної системи, в результаті чого на початкових стадіях інфекції відбувається швидкий синтез хлорофілів. Аналіз вмісту антоціанів показав, що кількість антоціанів після інфікування знижувалась (рисунок 3.34).

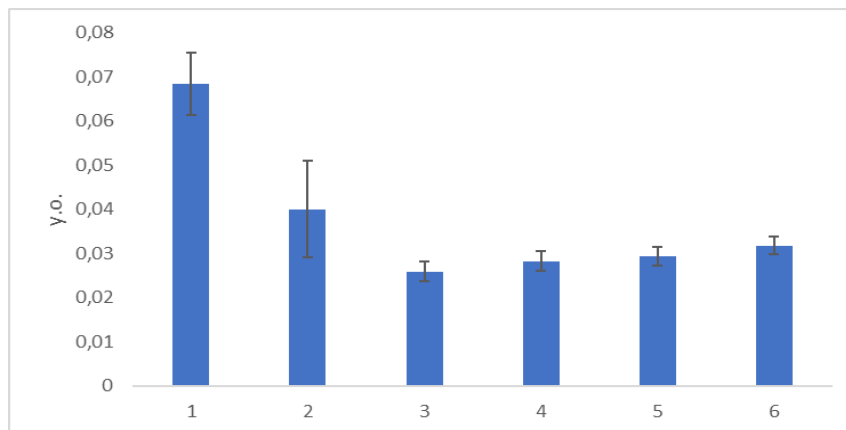


Рис.3.34 Вміст антоціанів в рослинах *N. benthamiana* агроінфільтрації векторними конструкціями pICH 27566 та pICH 6692 1 – не інфіковані рослини дикого типу; 2 – інфіковані рослини дикого типу; 3-6 – трансгенні лінії *N. benthamiana*.

Виявлено, що в інфікованих рослинах дикого типу відбувалося зниження кількості антоціанів у порівнянні з контролем. В трансгенних рослинах кількість пігменту знижувалася в 2-2.5 рази у порівнянні з неінфікованим контролем та в 1 раз у порівнянні з інфікованим контролем.

Антоціани є показниками розвитку стресових реакцій в рослинах і можуть бути асоційовані з розвитком АОА. Можна припустити, що низька кількість пігменту в трансгенних рослинах може свідчити про їх більший адаптивний потенціал до протидії стресовому чиннику викликаному фітовірусною інфекцією.

Додатково було проаналізовано співвідношення між кількістю антоціанів до хлорофілів. Дані досліджень представлені на рисунку 3.35.

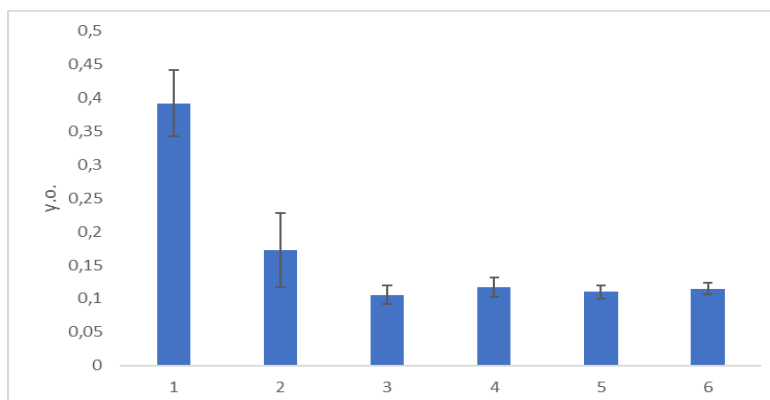


Рис.3.35 Співвідношення антоціанів до хлорофілів в рослинах *N. benthamiana* агроінфільтрації векторними конструкціями pICH 27566 та pICH 6692 1 – не інфіковані рослини дикого типу; 2 – інфіковані рослини дикого типу; 3-6 – трансгенні лінії *N. benthamiana*.

Аналіз співвідношення антоціанів до хлорофілів показав, що після інфікування в трансгенних рослинах цей показник був в 3 рази нижчим порівняно з інфікованими рослинами дикого типу, та 1.6 раз менше ніж в інфікованих. Отримані показники є свідченням більшої адаптативної спроможності трансгенних рослин.

Можна стверджувати, що експресія в рослинах гена *ZRNase II* не лише сповільнювала системне поширення вірусних частинок і призводили зміни стійкості до дії біотичного стресу, викликаного вірусною інфекцією.

3.4.8 ІЧ спектроскопія рослин *N. benthamiana*

Перед початком роботи було проаналізовано бази даних та створено модель типової спектрограми для родини Solanaceae.

Інфрачервона спектроскопія належить до абсорбційних спектроскопічних методів. Базується на здатності молекул поглинати ІЧ-випромінювання із збільшенням коливальної і обертальної енергій ковалентного зв'язку. ІЧ-ділянка спектра знаходиться приблизно від 0,8 до 200 мкм (довжини хвиль) або від 12 000 до 50,00 см⁻¹ (хвильові числа).

Довжинам хвиль від 0,7 до 2,5 мкм відповідають валентні коливання між атомами гідрогена та іншими атомами. Фундаментальні коливання відмічають між 2,5 і 50 мкм. Спектри поглинання у цій ділянці характерні для окремих часток, особливо інтенсивно використовують інтервал 2,5–15 мкм, де з'являється велика кількість піків поглинання функціональних груп. Смуги поглинання в інтервалі 15–50 мкм відповідають деформаційним коливанням важких атомів і груп атомів. ІЧ-спектри представляють двома способами: по осі ординат відкладають пропускання у відсотках, а вісь абсцис може бути калібрована у мкм (довжини хвиль) або см^{-1} (хвильові числа) залежно від вибору апаратури для реєстрації спектрів.

Аналіз проводили для рослин які не зазнавали впливу вірусу. Відбір проб проходив на стадії знаходження рослин в культурі *in vitro*. Було відібрано зразки двох трансформованих ліній *N. benthamiana*. Виявлено, що критичним параметром для відтворювальних даних є отримання ідеально висушений зразок. Для цього листя рослин механічно висушували в гербарному пресі в продовж двох місяців.

Аналіз проводили на ІЧ спектрометрі Nicollet IS50 ATR-FTIR. Оскільки клітинні стінки рослинних складаються з целюлози для вирішення проблеми різниці між товщиною, ступеню розвитку та кількості дрібних жилок в цільних листків досліджуваних варіантів використовували відносні показники (нормованих за целюлозою). Нормування показників по целюлозі характеризувало метаболізм клітин у досліджуваних зразках.

Досліджували показники співвідношення Амід II/Амід I, білків, ліпідів, нуклеїнових кислот, крохмалю, полісахаридів, лігніну, фенілпропаноїдів, фітофенолів.

Дані аналізу вказують, що експресія рибонуклеаз у листках трансгенних рослин позначається на первинному метаболізмі. У результаті чого у клітинах трансгенних рослин знижується вміст білків (рисунок 3.36).

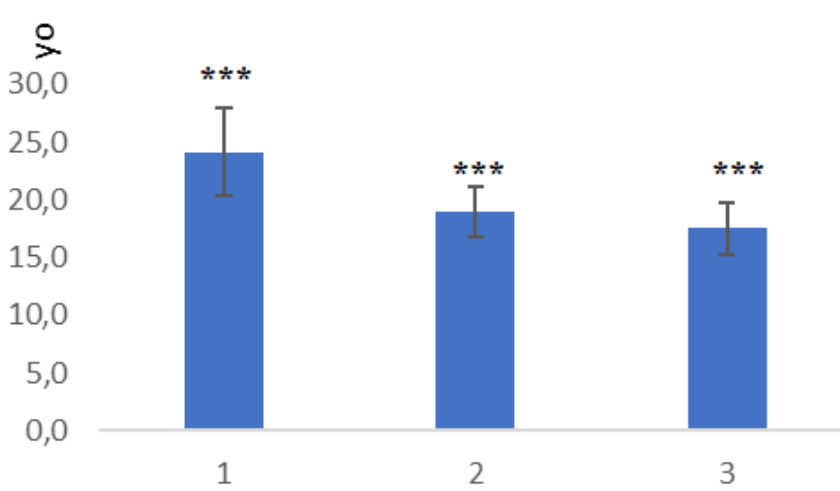


Рис 3.36 Вміст білків в рослинах *N. benthamiana*.

1– рослини дикого типу; 2 – рослини трансгенної лінії №2; 3 рослини трансгенної лінії №3. *** $P \leq 0,001$.

Також виявлено, що у трансгенних рослин змінюється конформація білкових доменів (рисунок 3.37)

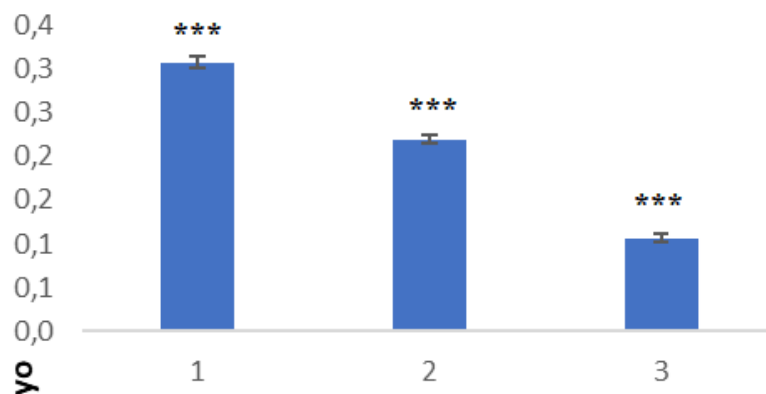


Рис 3.37 Співвідношення Амід II/Амід I в рослинах *N. benthamiana*.

1– рослини дикого типу; 2 – рослини трансгенної лінії №2; 3 рослини трансгенної лінії №3 *** $P \leq 0,001$.

В трансформованих рослинах відбувається перебудова білків, що обумовлено збільшенням бета-складчастих доменів у протеомі листків.

Виявлено також, що в трансгенних рослинах зменшується вміст крохмалю, лігніну та фітофенолів. При чому спостерігається впливу трансформації на вторинний метаболізм, в результаті чого вміст ліпідів, полісахаридів та фенілпропаноїдів залишається сталим. (графічно дані представлені в Додатку Б)

Згідно з даними ATR-FTIR, виявлено, що вміст нуклеїнових кислот у трансгенних рослин у цілому не знижується. Навпаки, внаслідок компенсаторної стимуляції синтезу РНК рівень нуклеїнових кислот у клітинах рослин може підвищуватись (рисунок 3.38).

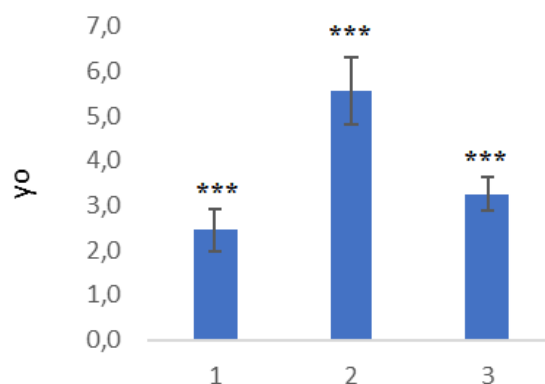


Рис.3.38 Вміст нуклеїнових в рослинах *N. benthamiana*.

1– рослини дикого типу; 2 – рослини трансгенної лінії №2; 3 рослини трансгенної лінії №3. *** $P \leq 0,001$.

Слід зазначити, що порушення сполученості між нуклеїновими кислотами, вміст яких у клітинах листя трансгенних рослин або не змінюється, або зростає та білками, вміст яких знижується. Ймовірно, це наслідок порушення експресії білків через трансгенну РНКазну активність, що розщеплює частину пулу мРНК у клітинах. Окрім того, це може бути пов'язано із зниження концентрації білків, що викликане зменшенням

інтенсивності їх синтезу *de novo*. Внаслідок цих процесів відбувається перебудова білкових доменів в бік збільшення частки бета-складчастих доменів. Порівняно з альфа-спіральними доменами, домени бета-складчастості є більш стійкі до деградації та протеолізу.

Перспективним напрямом подальших досліджень є використання та розробка конструкції з індукцйбельними промоторами замість конститутивних. При їх використанні експресія РНКаз активуватиметься виключно в клітинах, що зазнали зараження або постраждали від окисдативного стресу. Використання таких конструкцій не тільки позбавить негативного впливу трансгенної експресії РНКаз на здорові клітини, але, можливо, дасть додатковий захист від впливу факторів, що викликають окислювальний стрес за рахунок пригнічення метаболізму у найбільш постраждалих клітинах.

Висновки до розділу 3.5. Модельна система вірус-рослина показала, що в трансгенних рослинах *N. benthamiana* з геном *ZRNase II* відбувається чітко виражена затримка розвитку системної вірусної реакції у порівнянні з рослинами дикого типу. Виявлено, що у трансгенних рослинах змінюється низка показників накопичення первинних метаболітів та відбувається зміни в білковому складі та загальній кількості нуклеїнових кислот, що можливо є проявом впливу трансформації рослин геном *ZRNase II*. Таким, чином встановлено що в трансгенних рослинах з геном рибунулеази рослинного походження відбувається затримка розвитку інфекційного процесу. Використання даного гену є перспективним напрямком для подальших досліджень пов'язаних зі створенням вірусостійких рослин.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

В роботі представлено результати комплексного дослідження рослин родини Solanaceae з різними гетерологічними генами та особливості їх реакції на дію фітовірусної інфекції. Досліджували рослини *Solanum tuberosum*, *Petunia*×*hybrida* та *Nicotiana benthamiana* та *Nicotiana tabacum*.

Методами генетичної трансформації з використанням *Agrobacterium tumefaciens* були отриманні трансгенні рослини *N. tabacum* з геном *inf-α2b*. ПЛР аналіз підтвердив перенесення цільового гена в рослини. Після підтвердження наявності генетичної вставки було проведено визначення противірусної активності з екстрактів цих рослин на культурі клітин ПТП, яка була інфікована вірусом везикулярного стоматиту. Показано, що екстракти рослин мали інтерференоподібну активність проти вірусу. Трансгенні рослини *N. tabacum* з геном *inf-α2b* людини були інфіковані TMV, однак, незважаючи на противірусну активність екстракту на культурі клітин проти вірусу тварини і людини, зміни розвитку фітовірусної вірусної інфекції не було зафіксовано. Однак, в той же час трансгенні рослини за низкою біохімічних показників краще адаптувалися до біотичного стреса викликаного фітовірусною інфекцією. Електронне мікроскопічне дослідження не виявляло ультраструктурних змін в клітинах трансгенних рослин у порівнянні з рослинами дикого типу. Це є свідченням того, що генетична трансформація не призводить до перебудови клітин.

В рослинах *S. tuberosum* було встановлено присутність цільових генів *bov* та *ZRNase II*. Проаналізовані рослини були адаптовані до умов *ex vitro* та інокульовані PVY. Симптоматична картина вірусної інфекції для рослин дикого типу відрізнялася в залежності від сорту. Симптоми варіювалися від

найбільш виражених (сорт Ласунак) до помірних (сорт Слов'янка). Досліджувані трансгенні рослини *S. tuberosum* проявляли відстрочені симптоми вірусної інфекції. Серед проаналізованих сортів трансгенних рослин картоплі виділяли сорт Ласунак з геном *bov*, як найбільш сприйнятливий до PVY. У рослини сорту Лугівська з тим же геном, симптоматична картина була менш вираженою. Виявлено, що рослини в які мали ген *ZRNase II*, мали менші ознаки вірусної інфекції ніж ті в яких був ген *bov*.

Серед представлених сортів накопичення вірусного антигена було найменшим у рослин сорту Слов'янка. У трансгенних рослин вірусні антигени у сортах Лугівська та Ласунак з геноми *bov* накопичувалися в однаковій кількості з відповідними сортами рослин дикого типу. Водночас встановлено, що трансгенні рослини сорту Лугівської з геном *ZRNase II* характеризувалися найменшою кількістю антигена серед усіх проаналізованих рослин. Експресія гена *ZRNase II* забезпечувала більш чітко виражені зміни симптоматичної картини та зменшувала кількість вірусного антигена. Отримані дані дають підстави говорити про те, що ген РНКазі рослинного походження забезпечує значущі захисні реакції в рослинах *S. tuberosum*.

Оскільки результати використання гена *bov* виявилися менш показовими, в подальших дослідженнях увагу зосередили на трансформованих рослинах з геном *ZRNase II*. Для цього з колекції Інституту були взяті трансгенні рослини *Petunia×hybrida* з геном *ZRNase II*. Були використані сорти М1 та Р5.

Ці рослини мали активний ген *ZRNase II*, що було підтверджено методом ПЛР та ЗТ-ПЛР для визначення активності гена. Важливо відзначити, що

конституційна експресія гена не мала вплив на морфологію рослин, вирощених в теплиці.

Дослідження РНКазної активності в контрольних рослинах дикого типу показало різницю в активності між сортами М1 та Р5. В трансгенних рослинах активність РНКаз була вищою в 1,34 – 2,10 рази порівняно з рослинами дикого типу.

В подальшому рослини петунії рослини були інфіковані ТМV у концентрації 250 мкг/мл. В результаті було виявлено, що сорти петунії М1 і Р5 відрізняються як за візуальними ознаками наявності вірусної інфекції так і за результатами ІФА. Проведені дослідження продемонстрували різну чутливість рослин дикого типу М1 і Р5 до інфекції. За результатами візуальних спостережень на третій тиждень після інфікування спостерігались помітні вірусні симптоми для інфікованих контрольних рослин М1 та Р5.

В представлених дослідженнях було виявлено, що сорт Р5 має високу природну толерантність до ТМV. Оскільки прояви симптомів інфекції були незначними, а також низькими виявилися показники накопичення антигенів ТМV. В той же час сорт М1 виявився більш чутливим. Причини різної сприйнятливості до вірусу можуть бути пов'язані з певними генетичними особливостями сортів [58, 26].

Різниця між рослинами дикого типу та трансгенними лініями петунії сорту М1 стосовно наявності візуально детектованих симптомів і накопичення антигена зберігалась після інфікування. В той же час кількість антигена в інфікованих трансгенних лініях Р5 була подібна до відповідної кількості у контрольних рослинах. Отримані в процесі роботи результати демонструють більш легкий перебіг інфекції у інокульованих трансгенних рослин, та підтверджують попередні висновки [104].

У трансгенних рослинах *Petunia*×*hybrida* було досліджено вплив вірусної інфекції на розвиток стресреакції. Було проаналізовано загальну АОА та вміст початкового та кінцевого продуктів ПОЛ. Дослідження проводили в двох паралельних групах рослин, до інфікування та після інфікування.

З літературних джерел відомо, що підвищення в рослинах рівня АОА сприяє зростанню їх толерантності до дії різних стресових факторів. На розвиток ПОЛ і АОА може впливати ціла низка негативних факторів як біотичного і абіотичного характеру, зокрема, бактеріальні та вірусні хвороби [98, 9]. Достеменно встановлено, що зазначенні фактори пригнічують ріст і розвиток рослин, призводять до зниження врожайності та загибелі організму. Рослинні організми при впливі цих чинників активують свої захисні системи. Основними маркерами розвитку стрес реакції є накопичення ПОЛ: МД і ДК [6]. Накопичення цих продуктів в організмі рослин є показником розвитку стресових реакцій. Поряд із цим рослини можуть адаптуватися до дії негативних чинників через активацію механізмів, які пов'язані зі зниженням ПОЛ, а саме для перешкодження оксидативним пошкодженням активується цикл ферментативних захисних реакцій, спрямованих на протидію стреса [6]. Відомо, що в процесі розвитку стрес-реакції відбуваються зміни в накопиченні продуктів ПОЛ.

В даній роботі було показано, що у трансформованих незаражених рослин активність ПОЛ була подібною до відповідної активності у незаражених рослинах.

В інфікованих рослинах дикого типу фітовірусна інфекція спричинювала посилення процесів ПОЛ, активацію метаболічних процесів і загальний розвиток стрес-реакцій. Можна припустити, що рівень адаптивної

активності у контрольних рослин за наявності фітовірусної інфекції був нижчим, ніж у трансформованих рослинах.

Після детального аналізу рослин петунії подальша робота зосередилася на створенні модельної системи-вірус рослина. Така модель була необхідна для дослідження системного транспорту вірусів в трансгенних рослинах з геном *ZRNase II*, оскільки рослини петунії не давали чітко вираженої системної вірусної реакції. Модельна система була розроблена з використанням трансгенних рослин *N. benthamiana* з геном *ZRNase II*, які були створені в процесі досліджень. Отримані рослини були проаналізовані на наявність цільового гена та адаптовані до умов *ex vitro*, виділено чотири окремі незалежні лінії. В отриманих рослинах проводили аналіз загальної РНКазної активності. В результаті показало збільшення активності в усіх трансгенних лініях рослин у порівнянні з рослинами дикого типу.

Проаналізовані рослин *N. benthamiana* стали основою для тест системи вірус–трансгенна рослина. Розроблена система включала в себе елементи вірусу картоплі Х та флуоресцюючого білку GFP. Така система дала змогу виявити системне поширення вірусних частинок за рахунок специфічного свічення GFP. Встановлено, що у рослинах дикого типу розвиток системної вірусної реакції відбувався на другий тиждень після інфікування. Свічення GFP було детектовано в місці первинної інфільтрації та молодому листі рослин. Спостерігали також світіння GFP в судинних пучках, зокрема в центральних та бічних жилках та пагонах. В трансгенних рослин розвиток системної вірусної реакції був уповільненим. Виявилось, що незважаючи на високу РНКазну активність в трансгенних лініях №1 та №2, розвиток вірусної інфекції був швидшим, ніж в лініях №3 і №4. Так, в трансгенній лінії №1 розвиток системної реакції спостерігали на 5-6 дні пізніше, ніж в

контролі. В трансгенній лінії №2 спостерігали флуоресценцію GFP в молодому листі першого ярусу на 7-9 день після прояву інфекції в рослинах дикого типу, а в листах другого та третього ярусу через 14-15 днів. Розвиток системної реакції помітно сповільнювався в рослинних лініях на №3 та №4. Найбільш стійкою була лінія №3, де чітко виражену системну реакцію спостерігали лише через місяць після проявів інфекції в рослинах дикого типу. Можна стверджувати, що експресія в рослинах гена *ZRNase II* сповільнювала системне поширення вірусних частинок, однак залежала від лінії рослин. Ймовірною причиною того, що в рослинних лініях №1 та №2 при високих показниках РНКазної активності розвиток інфекції уповільнюється слабо, може означати про комплексний вплив гена *ZRNase II* на рослинний геном та слугувати сигналом проходження складних молекулярно біологічних процесів, пов'язаних з взаємодією перенесеного гена з рослинним геном.

Розроблена модельна система також була неінвазивно перевірена на вміст хлорофілів та антоціанів. Відомо, що антоціани відіграють значну роль в процесах захисту рослин від різних несприятливих чинників [121], і водночас під дією стреса в рослинах відбувається збільшення кількості хлорофілу [61]. Було встановлено, що після інфікування, рівень хлорофілу збільшувався в 1.5 рази, але кількість антоціанів знижувалась в трансгенних рослинах до 2-2.5 раз. Аналіз співвідношення антоціанів до хлорофілів показав, що після інфікування в трансгенних рослинах цей показник був в 2 рази нижчим порівняно тим, що спостерігали у рослинах дикого типу.

Результати ІЧ спектрометричного аналізу трансформованих рослин *N. benthamiana* показали зміни в первинних метаболічних процесах трансгенних рослин, при чому вторинні процеси не зазнавали змін. Відмічено порушення

сполученості між нуклеїновими кислотами, вміст яких у клітинах листя трансгенних рослин або не змінюється, або зростає, та білками, вміст яких знижувався. Ймовірно, це наслідок порушення експресії білків через трансгенну РНКазну активність, що розщеплює частину пулу мРНК у клітинах. Окрім того, це може бути пов'язано із зниження концентрації білків, що викликане зменшенням інтенсивності їх синтезу *de novo*. Внаслідок цих процесів відбувається перебудова білкових доменів в бік збільшення частки бета-складчастих доменів. Порівняно з альфа-спіральними доменами, домени бета-складчастості є більш стійкі до деградації та протеолізу.

Загалом представлені результати досліджень трансгенних рослин родини Solanaceae з генами різного походження показують виявленні зміни вірусостійкості. Отримані дані свідчать, що перспективним направленням є дослідження і подальша розробка векторних конструкцій на основі генів рибонуклеаз рослинного походження. Впровадження таких конструкції у перспективі дозволить покращити стратегії розвитку створення вірусостійких рослин.

ВИСНОВОК

На підставі отриманих даних було сформовано відповідні висновки:

Генетична трансформація з використанням різних генів гетерологічного походження може бути застосована для створення трансгенних рослин родини Solanaceae з підвищеною стійкістю до РНК вірусів; перенесення таких генів також приводить до ряду змін у функціонуванні клітин трансгенних рослин та веде до ряду біохімічних змін.

1. Генетична трансформація рослин *N. tabacum* дозволяє отримувати трансгенні рослини з геном *inf-α2b*. Продукт гена *inf-α2b* здатен проявляти противірусну активність на культурах клітин ПТП, яка залежить від лінії рослин і коливається в межах від 3274 до 6312 МО/г.
2. Генетична трансформація не впливає на ультраструктуру органел клітин рослин *N. tabacum*. За біохімічними параметрами (ПОЛ та АОА) трансгенні рослини з геном *inf-α2b* мають тенденцію до підвищення стресостійкості. Експресія гена *inf-α2b* в трансформованих рослинах *N. tabacum* не змінює перебіг вірусної інфекції TMV.
3. Довготривале субкультивування *in vitro* трансгенних рослин *Solanum tuberosum* з генами *ZRNase II* та *bov* не призводить до втрати цільових генів. Перенесення генів рибонуклеаз підвищує РНКазну активність у трансгенних рослинах на 11-12%. Незважаючи на підвищену РНКазну активність, у рослинах *S. tuberosum* не відбувається повна елімінація вірусу. Експресія гетерологічних генів рибонуклеаз призводить до зменшення накопичення вірусних антигенів в трансгенних рослинах на 10%.
4. Рослини *Petunia×hybrida* з геном *ZRNase II* мають у 1,85-2,10 рази вищу РНКазну активність. Експресія гена призводить до зменшення

накопичення вірусних антигенів в трансгенних рослинах в 2-3 рази. Перенесення гена *ZRNase II* дозволяє отримувати рослини *Petunia*×*hybrida* з підвищеною стійкістю до стресів.

5. *Agrobacterium tumefaciens* - опосередкована трансформація дозволяє отримувати трансгенні рослини *N. benthamiana* з геном *ZRNase II*. Експресія в рослинах гена *ZRNase II* в модельній системі приводить до уповільнення розповсюдження вірусу по рослині на 5-15 днів в залежності від лінії. Внаслідок синтезу РНКаз в трансгенних рослинах *N. benthamiana* відбувається конформаційна перебудова білкових структур в бік формування більшої кількості бета складчастих доменів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Akbar S., Wei Y., Zhang M. RNA Interference: Promising Approach to Combat Plant Viruses. *Int J Mol Sci.* 2022. 23(10). P. 5312. <https://doi.org/10.3390/ijms23105312>.
2. Akhter M.S., Nakahara K.S., Masuta C. Resistance induction based on the understanding of molecular interactions between plant viruses and host plants. *Virol J.* 2021. 18. P. 176. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01647-4>.
3. Alam I., Sharmin, S.A., Naher M., Alam M. et al Elimination and detection of viruses in meristem-derived plantlets of sweetpotato as a low-cost option toward commercialization. *Biotech.* 2013. 3(2). P.153-164. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0080-6>.
4. Ali S., Ganai B., Kamili A., Bhat A. et al. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological research.* 2018. 212 P. 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.008>.
5. Andersen E.J., Ali S., Byamukama E. et al. Disease Resistance Mechanisms in *Plants.* *Genes Basel.* 2018. 9(7). P.339. <https://doi.org/10.3390/genes9070339>.
6. Anwar A., Kim J.K. Transgenic breeding approaches for improving abiotic stress tolerance: recent progress and future perspectives. *Int J Mol Sci.* 2020. 21(8). P. 2695. doi:10.3390/ijms21082695.
7. Aseel D., Makhlof A., Riad S., Elmorsi A. et al. Two isolates of Potato virus Y (PVY) and the response of different potato cultivars against the viral

- infection. *Journal of Virological Antiviral Research*. 2015. 4(4). P. 1-5. doi: 10.4172/2324-8955.1000145.
8. Ausubel F.M. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunology*. 2005. 6. P. 973–979. <https://doi.org/10.1038/ni1253>.
 9. Baillo E.H., Kimotho R.N., Zhang Z., Xu P. Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement. *Genes Basel*. 2009. 10(10). P. 771. doi: 10.3390/genes10100771.
 10. Bald J.G. Cytological evidence for the production of plant virus ribonucleic acid in the nucleus. *Virol*. 1964. 22(3). P. 377–387. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(64\)90028-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(64)90028-5).
 11. Balint-Kurti P. The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Mol. Plant Pathol*. 2019. 20. P. 1163–1178. <https://doi.org/10.1111/mpp.12821>.
 12. Bariola P.A., MacIntosh G.C., Green P.J. Regulation of S-like ribonuclease levels in Arabidopsis. Antisense inhibition of RNS1 or RNS2 elevates anthocyanin accumulation. *Plant Physiol*. 1999. 119(1). P. 331-42. <https://doi.org/10.1104%2Fpp.119.1.331>.
 13. Beachy R.N. Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 1997. 8(2). P. 215-20. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(97\)80105-XSi](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(97)80105-XSi).
 14. Bertani G. Studies on lysogenesis. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. 1951. 62. P. 293-300.

15. Bevan M.W., Flavell R.B., Chilton M.D. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature*. 1983. 304(5922). P. 184–87.
16. Bhattacharyya D., Gnanasekaran P., Kumar R.K., et al A geminivirus betasatellite damages the structural and functional integrity of chloroplasts leading to symptom formation and inhibition of photosynthesis. *J. Exp. botany*. 2015. 66(19). P. 5881–5895. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv299>.
17. Boquel S., Zhang J., Goyer C., et al Effect of insecticide-treated potato plants on aphid behavior and potato virus Y acquisition. *Pest Management Science*. 2014. 71. P 1106–12. DOI: 10.1002/ps.3892.
18. Bradamante G., Mittelsten Scheid O., Incarbone M. Under siege: virus control in plant meristems and progeny. *The Plant Cell*. 2021. 33(8). P. 2523–2537 <https://doi.org/10.1093/plcell/koab140>.
19. Budzanivska I., Ovcharenko P., Kharina A., Boubriak I., Polischuk V. Nucleotide and amino acid sequences of a coatprotein of Ukrainian isolate of Potato virus Y: comparison with homologous sequences of other isolates and phylogenetic analysis. *Biopolymers and Cell*. 2014. 20. P. 41-148. doi: 10.7124/bc.00088D.
20. Burlakovskiy, M.S., Saveleva, N.V., Yemelyanov, V.V. et al. Production of bovine interferon-gamma in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2015. 122. P. 685–697. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0802-7>
21. Cao X., Lu Y., Di D., Zhang Z., Liu H. et al. Enhanced Virus Resistance in Transgenic Maize Expressing a dsRNA-Specific Endoribonuclease Gene from *E. coli*. *PLoS One*. 2014. 8(10). P. 1228-1232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060829>.

- 22.Chengke L. Richard S. The cell biology of Tobacco mosaic virus replication and movement *Front. Plant Sci.* 2013. 4(12). <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00012>.
- 23.Chung B. Kim J., Cho J., Cheong S., Jeong M. Tobacco mosaic virus detected in vegetatively propagated petunia hybrids “Surfinia.” *Plant Pathol J.* 2007. 23(1). P. 34–36. DOI: 10.5423/PPJ.2007.23.1.034.
- 24.Citores L., Iglesias R., Ferreras J. Antiviral Activity of Ribosome-Inactivating Proteins. *Toxins.* 2021. 13(2). P.80. <https://doi.org/10.3390/toxins13020080>.
- 25.Citovsky V. Tobacco mosaic virus: a pioneer of cell-to-cell movement. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1999. 354(1383). P. 637-43. doi: 10.1098/rstb.1999.0415.
- 26.Cohen J., Sikron N., Shuval S., Gera A. Susceptibility of vegetatively propagated petunia to tobamovirus infection and its possible control. *HortScience.* 1999. 34(2). P. 292–293. DOI: 10.21273/HORTSCI.34.2.292.
- 27.Conti G., Rodriguez M.C., Manacorda C.A., Asurmendi S. Transgenic expression of Tobacco mosaic virus capsid and movement proteins modulate plant basal defense and biotic stress responses in *Nicotiana tabacum*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2012. 25(10). P. 1370-84. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-12-0075-R>.
- 28.Cosson P., Schurdi-Levraud V., Le Q., Sicard O., et al The RTM resistance to potyviruses in *Arabidopsis thaliana*: natural variation of the RTM genes and evidence for the implication of additional genes. *PLoS One.* 2012. 7(6). e39169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039169>.
- 29.Dalakouras A., Dadami E., Wassenegger M. Engineering viroid resistance. *Viruses.* 2015. 7(2) P.634-646. doi: 10.3390/v7020634.

30. Davey M. High-throughput determination of malondialdehyde in plant tissues. *Jornal Biochem.* 2005. 347(2). P.201-7. DOI: 10.1016/j.ab.2005.09.041.
31. De Andrea M, Ravera R, Gioia D, Gariglio M, Landolfo S. The interferon system: an overview. *Eur J Paediatr Neurol.* 2002. 6 (41-6). P. 55-58. doi:10.1053/ejpn.2002.0573.
32. Deshpande R., Shankar V. Ribonucleases from T2 family. *Critical reviews in microbiology.* 2002. 28(2). P. 79–122. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046704>.
33. Ding L., Li Y., Wu Y., Li T., et al Plant disease resistance-related signaling pathways: recent progress and future prospects. *Int J Mol Sci.* 2022. 23(24). P.16200. <https://doi.org/10.3390/ijms232416200>.
34. Dodds P. N., Rathjen J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* 2010. 11. P. 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>.
35. Dong H., Huang Y., Wang K. The Development of Herbicide Resistance Crop Plants Using CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing. *Genes.* 2021. 12(6). P. 912. doi: 10.3390/genes12060912.
36. Dong O.X., Ronald P.C. Genetic Engineering for Disease Resistance in Plants: Recent Progress and Future Perspectives. *Plant Physiol.* 2019. 80(1). P. 26-38. doi: 10.1104/pp.18.01224.
37. Dormatey R., Sun C., Ali K., Fiaz S., Xu D., Calderon-Urrea A. et al. ptxD/Phi as alternative selectable marker system for genetic transformation for bio-safety concerns: a review. *Peer J.* 2021. 27(9):e11809. doi: 10.7717/peerj.11809.

38. Esau K. Viruses in plant hosts. Form, distribution and pathologic effects. *Madison; Milwaukee; London: Univ. Wisconsin Press*. 1968. P.225.
39. Feng Z., Li X., Fan B., Zhu C., Chen Z. Maximizing the Production of Recombinant Proteins in Plants: From Transcription to Protein Stability. *Int J Mol Sci*. 2022. 23(21):13516. doi: 10.3390/ijms232113516.
40. Flores, R. Highly Abundant Small Interfering RNAs Derived from a Satellite RNA Contribute to Symptom Attenuation by Binding Helper Virus-Encoded RNA Silencing Suppressors. *Frontiers in Plant Science*. 2016. 7. P. 692 <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00692>.
41. Fraley R.T., Rogers S.G., Horsch R.B. Genetic transformation in higher plants. *CRC Critical Rev. In: Plant Sciences*. 1986. 4. P. 1–46.
42. Gergerich R.C., Dolja V.V. Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. *The Plant Health Instructor*. 2006. DOI: 10.1094/PHI-I-2006-0414-01.
43. Golemboski D.B., Lomonossoff G.P., Zaitlin M. Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *Proc Natl Acad Sci*. 1990. 87(16) P.6311–6315. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.16.6311>.
44. Goodin M.M., Zaitlin D., Naidu R.A., Lommel S.A. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol Plant Microbe Interact*. 2008. 21(8). P. 1015-26. doi: 10.1094/MPMI-21-8-1015.
45. Grech-Baran M., Witek K., Szajko K., Witek A.I. et al Extreme resistance to Potato virus Y in potato carrying the Rysto gene is mediated by a TIR-NLR immune receptor. *Plant Biotechnol J*. 2020. 18(3). P.655-667. <https://doi.org/10.1111/pbi.13230>.
46. Green P. J. The ribonucleases of higher plants. *Annual review of plant biology*. 1994 45(1). P. 421-445.

47. Grout B.W. Meristem-tip culture for propagation and virus elimination. *Methods Mol Biol.* 1999. 111. P. 115-25. doi: 10.1385/1-59259-583-9:115.
48. Guevara-Morato M.A., de Lacoba M.G., Garcia-Luque I., Serra M.T. Characterization of a pathogenesis-related protein 4 (PR-4) induced in *Capsicum chinense* L3 plants with dual RNase and DNase activities. *J Exp Bot.* 2010. 61(12). P. 3259–3271. doi: 10.1093/jxb/erq148.
49. Gupta N., Reddy K., Bhattacharyya D. Plant responses to geminivirus infection: guardians of the plant immunity. *J. Virol.* 2021. 18(1). P.143. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01612-1>.
50. Hamacher J., Wettern M., Schulz M. Ubiquitination of TMV Coat Protein Aggregates in Infected Tobacco Leaves *Journal of Phytopathology.* 2003. 151(11-12) P 652–659. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00781.x>
51. Hohn, T. et al. Evolution of Integrated Plant Viruses. In: Roossinck, M.J. (eds) *Plant Virus Evolution.* Springer, Berlin, Heidelberg. 2008. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75763-4_4.
52. Hollings M. Disease control through virus-free stock. *Annual Review of Phytopathology.* 1965. 3(1). P. 367-396.
53. Holmes F.O. Inheritance of resistance to tobacco-mosaic disease in tobacco. *Phytopathology.* 1960. 12(1). P. 59-67. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(60\)90149-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(60)90149-5).
54. Huttner E., Tucker W., Vermeulen A., Ignart F., Sawyer B., Birch R. Ribozyme genes protecting transgenic melon plants against potyviruses. *Curr Issues Mol Biol.* 2001. 3(2). P, 27-34. <https://doi.org/10.21775/cimb.003.027>.
55. Jafarzade M., Ramezani M., Hedayati F., Mokhtarzade Z. et al Antibody-mediated resistance to rhizomania disease in sugar beet hairy roots. *Plant*

- Pathol J.* 2019. 35(6). P. 692-697.
<https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.04.2018.0073>.
56. Jain A., Jain R. Estimation of RNA using orcinol method. In: Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology. *Springer Protocols Handbooks*. Humana, New York. 2020. P. 73–75.
57. Jewehan, A., Salem, N., Toth, Z. et al. Screening of Solanum (sections Lycopersicon and Juglandifolia) germplasm for reactions to the tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV). *J Plant Dis Prot.* 2022. 129. P. 117–123. <https://doi.org/10.1007/s41348-021-00535-x>
58. Jiang T., Tao Z. Unraveling the mechanisms of virus-induced symptom development in plants. *Plants.* 2023. 12(15). P. 2830. <https://doi.org/10.3390/plants12152830>.
59. Johnson, A.M.A., Gopal, D.V.R.S., Sudhakar, C. GM Crops for Plant Virus Resistance: A Review. In: Kavi Kishor, P.B., Rajam, M.V., Pullaiah, T. (eds) *Genetically Modified Crops*. Springer, Singapore. 2021. https://doi.org/10.1007/978-981-15-5932-7_11.
60. Kachroo P., Yoshioka K., Shah J. et al. Resistance to turnip crinkle virus in Arabidopsis is regulated by two host genes and is salicylic acid dependent but NPR1, ethylene, and jasmonate independent. *Plant Cell.* 2020. 12. P. 677-690. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.5.677>.
61. Khaled Taïbi, Fadhila Taïbi et al. Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L., *South African Journal of Botany.* 2016. 105. P. 306-312. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.03.011>.

62. Khan MS, Nurjis F. Synthesis and expression of recombinant interferon alpha-5 gene in tobacco chloroplasts, a non-edible plant. *Mol Biol Rep.* 2012. 39(4). P. 4391-400. doi: 10.1007/s11033-011-1227-y.
63. Kochetov A., Shumny V. Transgenic plants as genetic models for studying functions of plant genes. *J Genet: Appl Res.* 2017. 7(4) P. 421-427. <https://doi.org/10.1134/S2079059717040050>.
64. Kumar P., Chandra S., Sangeeta Srivastava V. C. RGAs approach in identification of disease resistance genes and their deployment in crops improvement. *International Journal of Applied Agricultural Research.* 2017. 12(2) P. 185-198.
65. Kumar R., Kanwar S.S. Biotechnological production and applications of ribonucleases. *Biotechnological Production of Bioactive Compounds. Elsevier.* 2020. P. 363-389. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64323-0.00012-6>.
66. Kyrychenko A. M., Kovalenko O. G. Basic engineering strategies for virus-resistant plants. *Cytology and Genetics.* 2018. 52. P. 213-221. <https://doi.org/10.3103/S0095452718030076>.
67. Lacomme C., Glais L., Bellstedt D., Dupuis B., Karasev A., Jacquot E. Potato virus Y: biodiversity, pathogenicity, epidemiology and management *Springer Cham.* 2017. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-58860-5>.
68. Lanfermeijer F. C., Jiang G., Ferwerda M. A., Dijkhuis J. et al The durable resistance gene Tm-22 from tomato confers resistance against ToMV in tobacco and preserves its viral specificity. *Plant Science.* 2004. 167(4). P. 687-692. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.04.027>.
69. Langenberg W., Zhang L., Court D., Giunchedi L., Mitra A. Transgenic tobacco plants expressing the bacterial mc gene resist virus infection.

- Molecular Breeding*. 1997. 3. P. 391–399.
<https://doi.org/10.1023/A:1009697507261>.
70. Lapidot M., Gafny R., Ding B. et al A dysfunctional movement protein of Tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in trans-genic plants. *Plant J*. 1993. 4. P. 959–970.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.04060959.x>.
71. Lefeuvre P., Martin D. et al Evolution and ecology of plant viruses. *Nat Rev Microbiol*. 2019. 17. P. 632–644. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-02323>.
72. Lewandowski D.J Tobamovirus. Encyclopedia of Virology (Third Edition) *Academic Press*. 2008. P. 68-72. <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00514-8>.
73. Li F, Wang A. RNA-Targeted Antiviral Immunity: More Than Just RNA Silencing. *Trends in Microbiology*. 2019. 27(9):792-805.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.05.007>
74. Lindbo J., Falk W. The impact of “coat protein-mediated virus resistance” in applied plant pathology and basic research. *Phytopathology*. 2017. 107(6) P. 624-634 <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-16-0442-RVW>.
75. Lino Y., Sugimoto A., Yamamoto M. S.pombe Pac1, whose overexpression inhibits sexual development, encodes a ribonuclease III-like RNase. *EMBO*. 1991. 10. P. 221–226. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07939.x>.
76. Liu C., Nelson R.S. The cell biology of Tobacco mosaic virus replication and movement. *Front Plant Sci*. 2013. 11(4) P. 12. doi: 10.3389/fpls.2013.00012.
77. Liu S., Chen M. et al. Identification of positive and negative regulators of antiviral RNA interference in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*

- Communications*. 2022. 13(1). P. 2994. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30771-0>.
- 78.Lomonosoff G.P., Wege C. TMV Particles: The Journey From Fundamental Studies to Bionanotechnology Applications. *Adv Virus Res*. 2018. 102. P.149-176. doi: 10.1016/bs.aivir.2018.06.003.
- 79.MacIntosh G.C., Castandet B. Organellar and secretory ribonucleases: major players in plant RNA homeostasis. *Plant Physiology*. 2020. 183(4). P. 1438-1452. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00076>.
- 80.Mandadi K.K., Scholthof K.B. Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? *Plant Cell*. 2013. 5. P. 1489-505. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.111658>.
- 81.Manjunatha L., Rajashekara H., Uppala L.S. et al. Mechanisms of Microbial Plant Protection and Control of Plant Viruses. *Plants*. 2022. 11(24). P. 3449. <https://doi.org/10.3390/plants11243449>.
- 82.Marathe R., Anandalakshmi R., Liu Y., Dinesh-Kumar S.P. The tobacco mosaic virus resistance gene, N. *Mol Plant Pathol*. 2002. 3(3) P.167-72. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2002.00110.x>.
- 83.Mengist, A. A, Tenkegna T.A The role of miRNA in plant–virus interaction: a review. *Mol Biol Rep*. 2021. 48. P. 2853–2861. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06290-4>.
- 84.Miki B., McHugh S. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J Biotechnol*. 2004. 107(3). P. 193-232. doi: 10.1016/j.jbiotec.
- 85.Milosevic S., Simonovic A., Cingel A. et al. Introduction of dsRNA-specific ribonuclease *pac1* into *Impatiens walleriana* provides resistance to Tomato

- spotted wilt virus. *Scientia Horticulturae*. 2013. 164(17). P. 499-506. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.10.015>.
- 86.Mitra A., Higgins D.W., Langenberg W.G. et.al. A mammalian 2-5A system functions as an antiviral pathway in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci*. 1996. 93(13). P. 6780-5. doi: 10.1073/pnas.93.13.6780.
- 87.Monteiro F., Nishimura M. T. Structural, functional, and genomic diversity of plant NLR proteins: an evolved resource for rational engineering of plant immunity. *In Annual Review of Phytopathology*. 2018. 56. P. 243–267. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045817>.
- 88.Murashige T., Skoog F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures *Physiol. Plant*. 1962. 15(4). P. 473-497.
- 89.Mushegian A. R. Are there 10³¹ virus particles on Earth, or more, or fewer? *Journal of bacteriology*. 2020. 202 (9). P. 10-1128. <https://doi.org/10.1128/jb.00052-20>.
- 90.Musidlak O., Nawrot R., Gozdzicka-Jozefiak A. Which plant proteins are involved in antiviral defense? Review on in vivo and in vitro activities of selected plant proteins against viruses. *Int J Mol Sci*. 2017. 18(11). P. 2300. <https://doi.org/10.3390/ijms18112300>.
- 91.Nejidat A., Beachy R.N. Decreased levels of TMV coat protein in transgenic tobacco plants at elevated temperatures reduce resistance to TMV infection. *Virology*. 1989. 73(2). P. 531-8. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90565-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90565-5).
- 92.Niraula Prakash M., Vincent N. "Development and Adoption of Genetically Engineered Plants for Virus Resistance: Advances, Opportunities and Challenges" *Plants*. 2021. 10(11). P. 2339. <https://doi.org/10.3390/plants10112339>.

93. Ogawa T., Toguri T., Kudoh H. et al. Double-stranded RNA-specific ribonuclease confers tolerance against Chrysanthemum stunt viroid and Tomato spotted wilt virus in transgenic *Chrysanthemum* plants. *Breeding Science*. 2005a. 55(1). P. 49-55. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.55.49>.
94. Ogawa T., Toguri T., Kudoh H. et al. Transgenic potato expressing a double-stranded RNA-specific ribonucleases is resistant to Potato spindle tuber viroid. *Breeding Science*. 2005b. 15(12). P. 1290-4. <https://doi.org/10.1038/nbt1197-1290>.
95. Okada K., Kato T., Oikawa T., Komatsuda T., Namai K. A genetic analysis of the resistance in barley to soil-borne wheat mosaic virus. *Breed Sci*. 2020. 70(5). P. 617-622. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.20071>.
96. Ovcharenko O., Potrokhov A., Sosnovska D. et al. Increased virus resistance in transgenic petunia with heterologous ZRNase II gene. *JJBS*. 2023. 16(4). P. 587 – 592. <https://doi.org/10.54319/jjbs/160403>.
97. Ovcharenko O.O., Rudas V.A. Modern Approaches to Genetic Engineering in the Orchidaceae Family. *Cytol Genet*. 2020. 57(2). P.142–156. <https://doi.org/10.3103/S0095452723020093>.
98. Pandey P., Irulappan V., Bagavathiannan M.V., Senthil-Kumar M. Impact of combined abiotic and biotic stresses on plant growth and avenues for crop improvement by exploiting physio-morphological traits. *Front Plant Sci*. 2017. 18(8). P. 537. DOI: 10.3389/fpls.2017.00537.
99. Park C.J., Kim K.J., Shin R. et al. Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *Plant J*. 2003. 37(2). P. 186-198. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01951.x>.
100. Parrella G., Ruffel S., Moretti A. et al Recessive resistance genes against potyviruses are localized in colinear genomic regions of the tomato

- (*Lycopersicon* spp.) and pepper (*Capsicum* spp.) genomes. *Theor Appl Genet.* 2002. 105. P. 855–861. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1005-2>.
101. Peng J.C., Chen T.C., Raja J.A. et al. Broad-spectrum transgenic resistance against distinct tospovirus species at the genus level. *PLoS One.* 2014. 9(5):e96073. doi: 10.1371/journal.pone.0096073.
102. Perez K., Yeam I., Kang B.C., Ripoll D.R. et al. Tobacco etch virus infectivity in *Capsicum* spp. is determined by a maximum of three amino acids in the viral virulence determinant VPg. *Mol Plant Microbe Interact.* 2012. 25(12). P.1562-73. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-12-0091-R>.
103. Potrokhov A., Sosnovskaya D., Ovcharenko O. Антиоксидантна активність петуній із геном гетерологічної рибонуклеази ZRNase II, інфікованих вірусом тютюнової мозаїки. *Innovative Biosystems and Bioengineering.* 2020. 6(1). P. 40-45. <https://doi.org/10.20535/ibb.2022.6.1.254464>.
104. Potrokhov A., Sosnovska D., Ovcharenko O., Budzanivska I., Rudas V., Kuchuk M. Increased ribonuclease activity in *Solanum tuberosum* L. transformed with heterologous genes of apoplastic ribonucleases as a putative approach for production of virus resistant plants. *Turkish Journal of Biology.* 2021. 45(1). P. 79-87. <https://doi.org/10.3906/biy-2007-87>.
105. Prasad A., Sett S., Prasad M. Plant-virus-abiotic stress interactions: A complex interplay. *Environmental and Experimental Botany.* 2022. 199. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.104869>.
106. Prins M., Laimer M., Noris E., Schubert J., Wassenegger M. Tepfer M. Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Molecular Plant Pathology.* 2008. 9. P. 73-83. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00447.x>.

107. Pumplin N., Voinnet O. RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature reviews. Microbiology*. 2013. 11(11). P. 745–760. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3120>.
108. Raines R. Ribonuclease A. *Chemical Reviews*. 1998. 98(3). P. 1045-1066. <https://doi.org/10.1021/cr960427h>.
109. Ramkumar T.R., Lenka S.K., Arya S.S., Bansal K.C. A Short History and Perspectives on Plant Genetic Transformation. *Methods Mol Biol*. 2020. 2124. P.39-68. doi: 10.1007/978-1-0716-0356-7_3.
110. Rashid A., Lateef D. Novel techniques for gene delivery into plants and its applications for disease resistance in crops. *American Journal of Plant Sciences*. 2016. 7(1). P. 181-193. <https://doi.org/10.4236/ajps.2016.71019>.
111. Richard M., Knip M., Aalders T., Beijaert M.S, Takken F. Unlike many disease resistances, Rx1-mediated immunity to Potato virus X is not compromised at elevated temperatures. *Front Genet*. 2020. 11. P. 417. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00417>.
112. Rivkin, E. Deineko, M. Komarova, A. Kochetov, S. et al Analysis of virus resistance of tobacco and alfalfa transgenic plants bearing human β -interferon gene. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 1995. 9(1) P. 40-44 <https://doi.org/10.1080/13102818.1995.10818820>.
113. Rodríguez-Negrete E.A., Carrillo-Tripp J., Rivera-Bustamante R.F. RNA Silencing against geminivirus: complementary action of posttranscriptional gene silencing and transcriptional gene silencing in host recovery. *J. Virology*. 2009. 83(3). P.1332-40. <https://doi.org/10.1128/JVI.01474-08>.

114. Ronde de D., Butterbach P., Kormelink R. Dominant resistance against plant viruses. *Front Plant Sci.* 2014. 5. P. 307. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00307>.
115. Rubio M., Martínez-Gómez P., Dicenta F. Apricot breeding for multiple resistance to Plum pox virus and Apple chlorotic leaf spot virus. *Scientia Horticulturae.* 2023. P.309. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111706>.
116. Ruffel S., Dussault M.H., Palloix A., Moury B. et al. A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J.* 2002. 32(6). P.1067-75. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01499.x>.
117. Ruffel S., Gallois J.L., Lesage M.L., Caranta C. The recessive potyvirus resistance gene pot-1 is the tomato orthologue of the pepper pvr2-eIF4E gene. *Mol Genet Genomics.* 2005. 274. P. 346–353. <https://doi.org/10.1007/s00438-005-0003-x>.
118. Saez C., Flores-Leon A., Montero-Pau J. et al. RNA-Seq transcriptome analysis provides candidate genes for resistance to tomato leaf curl new Delhi virus in melon. *Front. Plant Sci.* 2022. 8(12). P. 798858. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.798858>.
119. Safarnejad M.R., Jouzani G.S., Tabatabaie M., Twyman R.M., Schillberg S. Antibody-mediated resistance against plant pathogens. *Biotechnol Adv.* 2011. 29:961-971. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.011>.
120. Salgotra R.K., Stewart C.N. Functional markers for precision plant breeding. *Int J Mol Sci.* 2020. 21(13). P. 4792. <https://doi.org/10.3390/ijms21134792>.

121. Samuel Chaves-Silva, Adolfo Luís dos Santos et al Understanding the genetic regulation of anthocyanin biosynthesis in plants – Tools for breeding purple varieties of fruits and vegetables. *Phytochemistry*. 2018. 153. P. 11-27. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.05.013>.
122. Sangaev S., Kochetov A., Ibragimova S.S., Levenko B., Shummy V. Physiological role of extracellular ribonucleases of higher plants. *J Genet: Appl Res*. 2011. 1(1). P.44-50. <https://doi.org/10.1134/S2079059711010060>
123. Sangaev S., Trifonova E., Titov S., Romanova A., Kolodyazhnaya Y. et al. Effective expression of the gene encoding an extracellular ribonuclease of *Zinnia elegans* in the SR1 *Nicotiana tabacum* plants. *J Genet*. 2007. 43(7). P. 831-833. <https://doi.org/10.1134/S1022795407070186>.
124. Sano T., Nagayama A., Ogawa T., Ishida I., Okada Y. Transgenic potato expressing a double-stranded RNA-specific ribonucleases is resistant to potato spindle tuber viroid. *Nature Biotechnology*. 1997. 15(12). P. 1290-1294. <https://doi.org/10.1038/nbt1197-1290>.
125. Sastry K.S., Mandal B., Hammond J., Scott S.W., Briddon R.W. Encyclopedia of Plant Viruses and Viroids. *Springer, New Delhi Springer Nature India Private Limited*. 2019. P. 2936.
126. Scaria V., Hariharan M., Maiti S., Pillai B., Brahmachari S.K. Host-virus interaction: a new role for microRNAs. *Retrovirology*. 2006. 3. P. 68 <https://doi.org/10.1186/1742-4690-3-68>.
127. Scholthof K.B. Tobacco mosaic virus: a model system for plant biology. *Annu Rev Phytopathol*. 2004. 42. P. 13-34. doi: 10.1146/annurev.phyto.42.040803.140322.

128. Sehrish A., Wei Y., Zhang M.Q. RNA Interference: Promising approach to combat plant viruses. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. 23(10). P. 5312. <https://doi.org/10.3390/ijms23105312>.
129. Sekine K., Kawakami S., Hase S. et al. High-level expression of a virus resistance gene, RCY1, confers extreme resistance to Cucumber mosaic virus in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact*. 2008. (11). P. 1398-407. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-11-1398>.
130. Seo Y.S., Rojas M.R., Lee J.Y, Lee S.W. et al. A viral resistance gene from common bean functions across plant families and is up-regulated in a non-virus-specific manner. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006. 103(32). P. 11856-61. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604815103>.
131. Shaikhaldein H.O., Hoffmann B., Alaraidh I.A. et al. Evaluation of extreme resistance genes of Potato virus X (Rx1 and Rx2) in different potato genotypes. *J Plant Dis Prot*. 2018. 125. P. 251–257. <https://doi.org/10.1007/s41348-018-0148-6>.
132. Sheat S., Winter S. Developing broad-spectrum resistance in cassava against viruses causing the cassava mosaic and the cassava brown streak diseases. *Front Plant*. 2023. 14. P, 1042701. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1042701>.
133. Shen W.X., Au P.C., Shi B.J., et al. Satellite RNAs interfere with the function of viral RNA silencing suppressors. *Front. Plant Sci*. 2015. 6. P. 281. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00281>.
134. Siar S.V., Beligan G.A., Sajise A.J et al. Papaya ringspot virus resistance in *Carica papaya* via introgression from *Vasconcellea quercifolia*. *Euphytica*. 2011. 181. P. 159-168. <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-011-0388-z>.

135. Sindarovska Y.R et al Ribonuclease activity of buckwheat plant (*Fagopyrum esculentum*) cultivars with different sensitivities to buckwheat burn virus. *Ukrainian biochemical journal*. 2014. 86(3). P. 33-40. <https://doi.org/10.15407/ubj86.03.033>.
136. Sindelarova M., Sindelar L. Isolation of pathogenesis-related proteins from TMV-infected tobacco and their influence on infectivity of TMV. *Plant Protection Science*. 2018. 41(2). P. 52-57. <https://doi.org/10.17221/2747-PPS..>
137. Singh A., Taneja J., Dasgupta I., Mukherjee S.K. Development of plants resistant to tomato geminiviruses using artificial trans-acting small interfering RNA. *Mol Plant Pathol*. 2015. 16. P. 724–734 <https://doi.org/10.1111/mpp.12229>.
138. Su W., Xu M., Radani Y., Yang L. Technological Development and Application of Plant Genetic Transformation. *Int J Mol Sci*. 2023. 24(13). P. 10646. doi: 10.3390/ijms241310646.
139. Sugawara T., Trifonova E., Kochetov A., Kanayama Y. Expression of an extracellular ribonuclease gene increases resistance to Cucumber mosaic virus in tobacco. *BMC Plant Biology*. 2016. 16(3). P. 246. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0928-8>.
140. Takken F. L. W., Albrecht M., Tameling W. I. L. Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Curr Opin Plant Biol*. 2006. 9. P. 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.05.009>.
141. Taninaka Y., Nakahara K.S., Hagiwara-Komoda Y. Intracellular proliferation of clover yellow vein virus is unaffected by the recessive resistance gene *cyv1* of *Pisum sativum*. *Microbiol Immunol*. 2020. 64(1). P. 76-82. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12755>.

142. Tatineni S., Hein G. L. Plant viruses of agricultural importance: Current and future perspectives of virus disease management strategies. *Phytopathology*. 2023. 113(2). P. 117-141. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-22-0167-RVW>.
143. Teixeira R.M., Ferreira M.A., Raimundo G.A., Fontes E.P. Geminiviral Triggers and Suppressors of Plant *Antiviral Immunity*. *Microorganisms*. 2021. 9(4). P. 775. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040775>.
144. Trifonova E., Romanova A., Sangaev S. et al. Inducible expression of the gene of *Zinnia elegans* coding for extracellular ribonuclease in *Nicotiana tabacum* plants. *Biologia Plantarum*. 2012. 56. P. 571-574. <https://doi.org/10.1007/s10535-011-0206-4>
145. Trifonova E., Sapotsky M., Komarova M., Scherban A. et al. Protection of transgenic tobacco plants expressing bovine pancreatic ribonuclease against tobacco mosaic virus. *Plant Cell Reports*. 2007. 26(7). P. 1121-6. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0298-z>.
146. Vandenbussche M., Chambrier P., Rodrigues Bento S., Morel P. Petunia, Your Next Supermodel? *Front Plant Sci*. 2016. 2(7) P. 72. doi: 10.3389/fpls.2016.00072.
147. Varma A. Integrated management of plant viral diseases. Ciba Found *Symp. Chichester. UK: John Wiley & Sons, Ltd*. 1993. 177. P. 140-57. <https://doi.org/10.1002/9780470514474.ch9>.
148. Verchot J. Plant Virus infection and the ubiquitin proteasome machinery: arms race along the endoplasmic reticulum. *Viruses*. 2016. 8(11) P. 314. <https://doi.org/10.3390/v8110314>.

149. Verma K. K., Song X. P., Budeguer F., Nikpay A., Enrique R. et al. Genetic engineering: an efficient approach to mitigating biotic and abiotic stresses in sugarcane cultivation. *Plant Signal Behav.* 2022. 17(1):2108253. doi: 10.1080/15592324.2022.2108253.
150. Wang G., Dong Y., Liu X., Yao G., Yu X., Yang M. The Current Status and Development of Insect-Resistant Genetically Engineered Poplar in China. *Front Plant Sci.* 2018. 21(9). P. 1408. doi: 10.3389/fpls.2018.01408.
151. Wang M.R., Hamborg Z., Blystad D.R., Wang Q.C. Combining thermotherapy with meristem culture for improved eradication of onion yellow dwarf virus and shallot latent virus from infected in vitro-cultured shallot shoots. *Ann. Appl. Biol.* 2021. 178(3). P. 442-449. <https://doi.org/10.1111/aab.12646>.
152. Wang, W., Wang, J., Feng, X., Shen, L. et al. Breeding of virus-resistant transgenic sugarcane by the integration of the Pac1 gene. *Frontiers in Sustainable Food Systems.* 2022 6. 925839 <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.925839>.
153. Watanabe T., Ogawa H., Takahashi I., Ishida Y., Takeuchi Y. et al. Resistance against multiple plant viruses in plants mediated by a double stranded-RNA specific ribonuclease. *FEBS Letters.* 1995. 372(2-3). P. 165-168. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00901-K](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00901-K).
154. Xie Z., Fan B., Chen C., Chen Z. An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001. 98(11). P. 6516-21. <https://doi.org/10.1073/pnas.111440998>.
155. Yang X., Niu L., Zhang W., He H., Yang J. et al. Increased multiple virus resistance in transgenic soybean overexpressing the double-strand

- RNA-specific ribonuclease gene PAC1. *Transgenic Research*. 2019. 28. P. 129-140. <https://doi.org/10.1007/s11248-018-0108-8>.
156. Yang Z., Li Y. Dissection of RNAi-based antiviral immunity in plants. *Curr. Opin. Virol.* 2018. 32. P. 88-99. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.08.003>.
157. Ye Z.H., Droste D.L. Isolation and characterization of cDNAs encoding xylogenesis-associated and wounding-induced ribonucleases in *Zinnia elegans*. *Plant Molecular Biology*. 1996. 30. P. 697-709. <https://doi.org/10.1007/BF00019005>.
158. Younis A., Siddique M.I., Kim C.K., Lim K.B. RNA Interference (RNAi) induced gene silencing: a promising approach of Hi-tech plant breeding. *Int J Biol Sci*. 2014. 10(10). P. 1150-1158. <https://doi.org/10.7150/ijbs.10452>.
159. Zand Karimi H., Innes R. W. Molecular mechanisms underlying host-induced gene silencing. *The Plant Cell*. 2022. 34(9). P. 3183–3199. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac165>.
160. Zare A., Zarghami R., Naderpour M. et al. Assessment of virus eradication methods from infected in vitro-grown apricot cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2024. 156 (52). <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02621-4>.
161. Zhang L., French R., Langenberg W., Mitra A. Accumulation of barley stripe mosaic virus is significantly reduced in transgenic wheat plants expressing a bacterial ribonuclease. *Transgenic Research*. 2001. 10(1). P. 13-9. <https://doi.org/10.1023/a:1008931706679>.
162. Zhirnov I.V., Trifonova E.A., Romanova A.V. et al. Induced expression of *Serratia marcescens* ribonuclease III gene in transgenic

- Nicotiana tabacum* L. cv. SR1 tobacco plants. *Journal of Genetics*. 2016. 52(11). P. 1256-61. <https://doi.org/10.1134/S102279541611017X>.
163. Zhu M., Jiang L., Bai B., Zhao W., Chen X., Li J. et al The intracellular immune receptor sw-5b confers broad-spectrum resistance to tospoviruses through recognition of a conserved 21-amino acid viral effector epitope. *Plant Cell*. 2017. 29(9). P. 2214–223. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00180>.
164. Zhu S., Jeong R.D., Lim G.H., Yu K. et al. Double-stranded RNA-Binding protein 4 is required for resistance signaling against viral and bacterial pathogens. *Cell reports*. 2013. 4(6). P.1168-84. doi: 10.1016/j.celrep.2013.08.018.
165. Ивановский Д. И. О двух болезнях табака. Табачная пепелица, мозаичная болезнь *Сельское хозяйство и лесоводство*. 1892.

Додаток А

Список опублікованих праць за темою дисертації

Статті в наукових періодичних фахових виданнях України

1. **Потрохов А. О.** Антиоксидантна активність трансгенних рослин *Nicotiana tabacum* L з геном *ifn- α 2b* людини, інфікованих вірусом тютюнової мозаїки. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол.* 2015, № 2(63) С 58-64. (Категорія Б) (відбір матеріалу, проведення досліджень, участь в узагальненні отриманих даних і написанні статті)
2. **Потрохов А. О.,** Зубр З. В, Трохименко О. П., Матвєєва Н. А. Оцінка противірусної активності екстрактів із трансгенних рослин тютюну з геном інтерферону α -2b людини. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол.* 2017. 3(70) С.64-69. (Категорія Б) (відбір матеріалу, проведення досліджень, узагальнення отриманих даних і написання статті)
3. **Потрохов А.О.,** Сосновська Д.І., Овчаренко О.О. Антиоксидантна активність петуній із геном гетерологічної рибонуклеази *ZRNase II*, інфікованих вірусом тютюнової мозаїки. *Innov Biosyst Bioeng.* 2022. 6(1). С. 40–45. doi: 10.20535/ibb.2022.6.1.254464; **Q4 Scopus** (Категорія А) (відбір матеріалу, проведення досліджень, участь в узагальненні отриманих даних і написанні статті)
4. **Потрохов А.,** Овчаренко О. Стратегії створення стійких до вірусів рослин: фокус на РНКазах. *Цитологія і генетика.* 2024. 58(2). С.24- 43. **Q3 Scopus** (Категорія А) (аналіз наукової літератури, участь у написанні статті)

Статті в інших наукових виданнях

5. **Potrokhov A.**, D. Klymchuk, Yu. Akimov, N. Matvieieva, E. Trokhimenko, I. Dzuiblyk, M. Kuchuk Ultrastructural characteristics of mesophyll cells of transgenic tobacco plants with human interferon alpha 2b gene infected by tobacco mosaic virus. *Genetics and Plant Physiology*. 2014. 4(3-4). P. 174–181 (відбір матеріалу, проведення досліджень, участь в узагальненні отриманих даних і написанні статті)
6. **Potrokhov A.**, Sosnovska D, Ovcharenko O, Budzanivska I, Rudas V, Kuchuk M. Increased ribonuclease activity in *Solanum tuberosum* L. transformed with heterologous genes of apoplastic ribonucleases as a putative approach for production of virus resistant plants. *Turk J Biol*. 2021. 45(1). P. 79-87. doi: 10.3906/biy-2007-87. **Q2 Scopus**; (відбір матеріалу, проведення досліджень, участь в узагальненні отриманих даних і написанні статті)
7. Ovcharenko O., **Potrokhov A.**, Sosnovska D., Hoysyuk Y, Yaroshko O, Shevchenko T, Budzanivska I., Rudas V., Kuchuk M. Increased virus resistance in transgenic petunia with heterologous *ZRNase II* gene. *Jordan Journal of Biological Sciences*. 2023. 16(4). P. 587 – 592. <https://doi.org/10.54319/jjbs/160403> **Q3 Scopus**; (відбір матеріалу, проведення досліджень, участь в узагальненні отриманих даних і написанні статті)

Матеріали та тези доповідей конференцій

8. Sosnovskaya D.O., **Potrochov A.A.**, Ovcharenko O.O., Rudas V.A., Kuchuk M.V. Analysis of RNase activity and resistance to Potato virus Y in transgenic potato lines containing bovine pancreatic RNase cDNA

International conference “Bioresource and viruses” September 9-11,2019, Kiev, Ukraine p.98.

9. **Potrokhov A.**, Ovcharenko O. Antioxidant activity of transgenic *Petunia hybrida* Vilm. with heterologous *ZRNase II* gene after tobacco mosaic virus infection. 5th International Scientific Conference Agrobiodiversity for Improving the Nutrition, Health, Quality of Life and Spiritual Human Development. November 3rd, 2021, Nitra, p.108. <https://doi.org/10.15414/2021.9788055224015>
10. Гойсюк Ю.Ю., **Потрохов А.О.**, Овчаренко О.О., Моргун Б.В. Створення трансгенного тютюну з геном екстраклітинної рибонуклеазидинії як модельного об’єкта для вивчення стійкості до широкого спектру вірусів рослин біотехнологія XXI століття. Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття», 20 травня 2020, Київ, с.25.
11. **Potrokhov A.**, Ovcharenko O. Transgenic petunia with *ZRNase II* gene as a novel model system for investigation of virus resistance International Scientific Conference Innovation in Science: Global Trends and Regional Aspect: Conference Proceedings, March 12-13, 2021, Riga, p. 6-8. <https://doi.org/10.30525/978-9934-26-050-6-3>
12. Сосновська Д. І., **Потрохов А. О.**, Овчаренко О. О. "Використання генів гетерологічних рибонуклеаз для підвищення стійкості рослин до фітовірусів." XV Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія XXI століття» присвячена 20-річчю Факультету біотехнології і біотехніки КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2021, Київ, с 94.

13. Sosnovska D., Yuliya Hoysyuk, Olha Yaroshko, **Andrii Potrokhov**, Tetiana Shevchenko, Irena Budzanivska, Olga Ovcharenko, Mykola Kuchuk "Increased virus resistance in transgenic petunia with heterologous *ZRNase II* gene" SEAB 2021, July 01-03, 2021 p. 280.
14. **Potrokhov A. O.**, Solomka O. S., Yaroshko O. M., Ovcharenko O. O. Obtaining of transgenic *Nicotiana benthamiana* plants with heterologous *ZRNase II* gene to produce a model for study of influence of extracellular ribonucleases on plant resistance to virus movement Mendel Genetics Conference. A tribute to Gregor Johann Mendel on the bicentennial of his birth. July 20—23, 2022, Brno, p. 159.
15. Serazhym A.Y., **Potrokhov A.O.**, Ovcharenko O.O. Peculiarities of the development of systemic viral reactions in *Nicotiana benthamiana* plants expressing the heterologous *ZRNase II* gene. X International Conference,, Bioresources and Viruses“ September 11-13, 2023, Kyiv, p. 83.
16. **Потрохов А.О.**, Матвеева Н.А. Перенесення гена інтерферону- $\alpha 2b$ людини в рослини *Nicotiana tabacum* L Біоресурси і віруси 10-13.09, 2013, Київ, с.56.
17. **Потрохов А.О.**, Матвеева Н.А. Дослідження антиоксидантної активності та вмісту фруктанів у трансгенних рослинах *Nicotiana tabacum* L. з геном *ifn- $\alpha 2b$* людини, інфікованих вірусом тютюнової мозаїки. Друга конференція молодих учених Біологія рослин та біотехнологія .ІХБГ 23-24.12- 2013, Київ, с. 66.
18. Ісаєва Є.В., Лісняк А.А., Трохименко О.П., **Потрохов А.О.**, Дробот К.О., Матвеева Н.А. Противірусна дія екстрактів з бородатих коренів рослин, що мають ген інтерферону- $\alpha 2B$ людини. ІХ Всеукраїнська

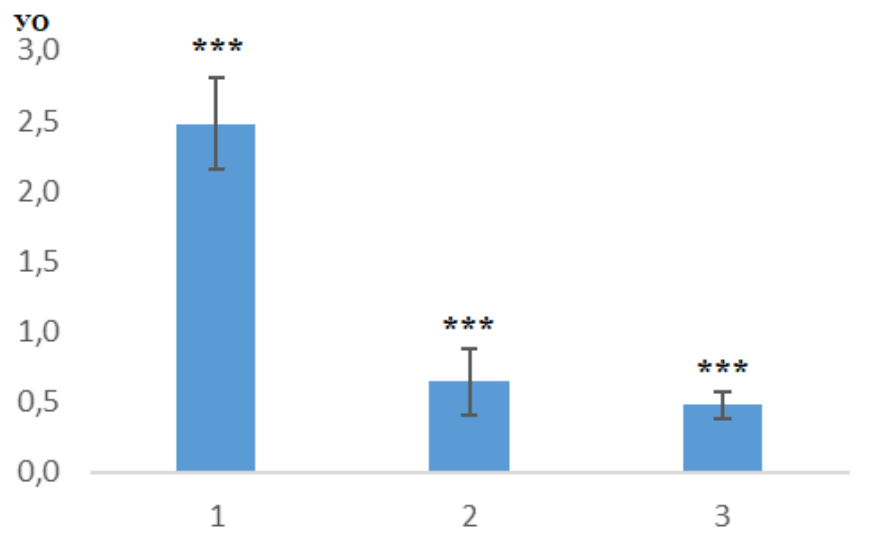
науково-практична конференції «Біотехнологія ХХІ століття» 24 квітня 2015, Київ, с.45.

19. Ісаєва Є.В., Лісняк А.А., Трохименко О.П., **Потрохов А.О.**, Дробот К.О., Матвєєва Н.А. Противірусна дія рекомбінантного інтерферону- $\alpha 2b$ людини з екстрактів трансгенних коренів рослин різних видів. IV Всеукраїнсько науково-практична конференція Біотехнологія: звершення та надії конференції 21-22 травня 2015, Київ, с. 56-57.

Додаток Б.1

Результатами ATR-FTIR аналізу вмісту первинних метаболітів рослин

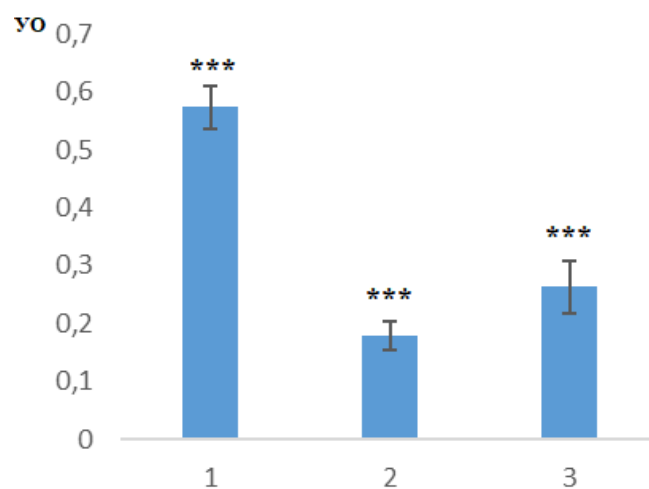
N. bentamiana



Вміст крохмалю в рослинах *N. bentamiana*;

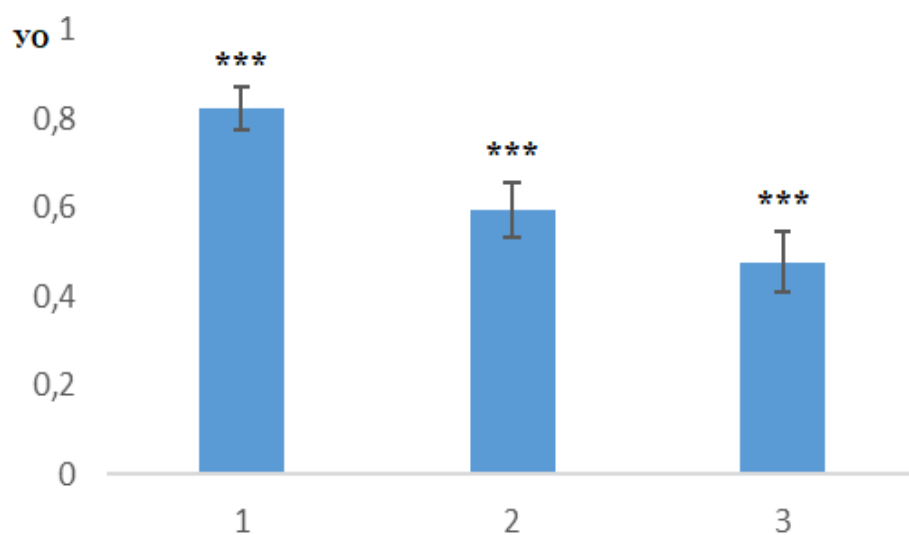
1– контрольні рослини; 2– трансгенна лінія №2; 3 –трансгена лінія №3

*** $P \leq 0,001$.



Вміст лігніну в рослинах *N. bentamiana*;

1– контрольні рослини; 2– трансгенна лінія №2; 3 –трансгена лінія №3 *** $P \leq 0,001$.



Вміст фітофенолів в рослинах *N. bentamiana*;

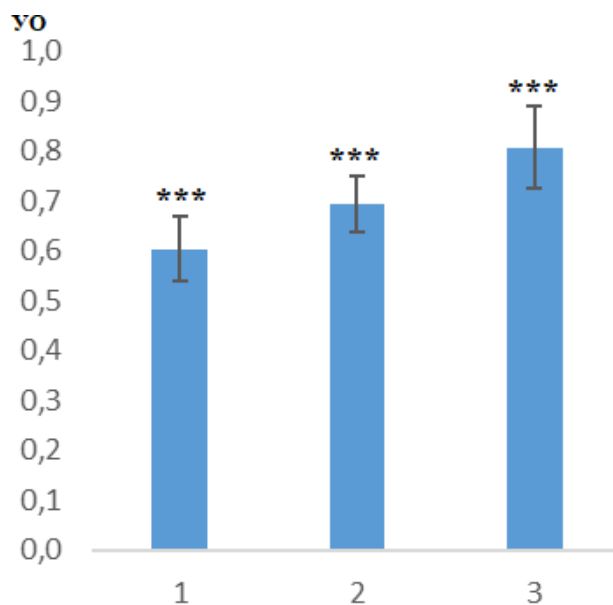
1– контрольні рослини; 2– трансгенна лінія №2; 3 –трансгена лінія №3

*** $P \leq 0,001$.

Додаток Б.2

Результатами ATR-FTIR аналізу вмісту вторинних метаболітів рослин

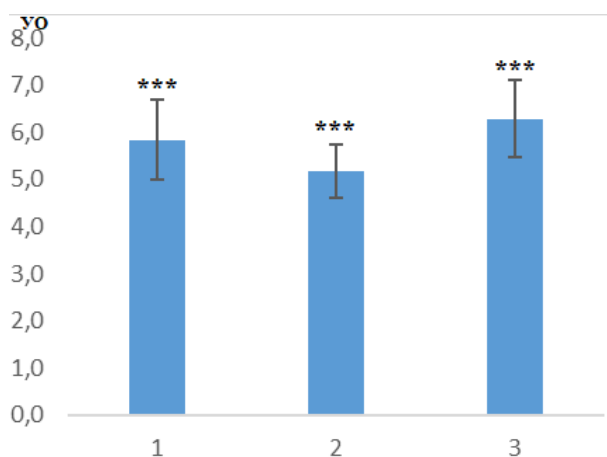
N.bentamiana



Вміст полісахаридів в рослинах *N. bentamiana*;

1– контрольні рослини; 2– трансгенна лінія №2; 3 –трансгена лінія №3

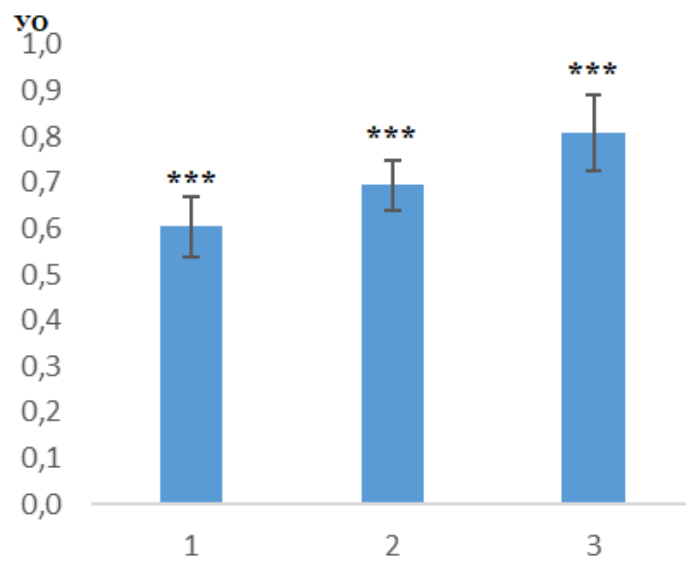
*** $P \leq 0,001$.



Вміст ліпідів в рослинах *N. bentamiana*;

1– контрольні рослини; 2– трансгенна лінія №2; 3 –трансгена лінія №3

*** $P \leq 0,001$.



Вміст фенілпропаноїдів в рослинах *N. bentamiana*;

1– контрольні рослини; 2– трансгенна лінія №2; 3 –трансгена лінія №3

*** $P \leq 0,001$.