

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
“КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО”

ПОТРОХОВ АНДРІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ

УДК 60.604

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

03.00.20 – біотехнологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ 2024

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Матвєєва Надія Анатоліївна,
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
завідувачка лабораторії адаптаційної біотехнології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник.
Дубровна Оксана Василівна,
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник,
Шевченко Олексій Володимирович,
доцент кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету ім. Т. Шевченка

Захист відбудеться « » вересня 2024 р. о годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.26.002.28 при Національному технічному університеті України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» (03056, м. Київ Берестейський проспект, 37)

Автореферат розісланий « » липня 2024 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради

д.т.н., доцент

Голуб Н. Б.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Використання методів генетичної інженерії надало можливість цілеспрямованого створення рослин з новими властивостями. В основі методу генетичної трансформації рослин покладено перенесення та вбудовування цільових генів в рослинний геном [Ramkumar T., 2020]. За останні 30 років було створено низку трансгенних рослин, що належать до різних видів і родів [Ramkumar T., 2020]. 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 до дії стресових факторів, як біотичного так і абіотичного характеру [Su W., 2023]. Методи генетичної інженерії дозволяють зменшувати шкідливу для рослин дію негативних факторів навколишнього середовища. Основними напрямками нових розробок є підвищення стійкості до грибкових, бактеріальних [Dormatey R., 2021], вірусних інфекцій [Niraula, 2021], комах [Wang G, 2018], гербіцидів [Dong H., 2021] та створення рослин-продуцентів рекомбінантних білків та біологічно активних речовин [Feng Z., 2022].

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) [Kyrychenko A. M., 2018]. 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 [Peng J.C., 2014]. У відповідь на вірусну інфекцію рослини синтезують спеціалізовані захисні білки, які називаються PR-білки [Akhter M.S., 2021], які здатні неспецифічно індукувати «іммунну 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. [Sugawara T., 2016]. У рослинах РНКази виконують роль «рослинних Т-кіллерів» завдяки своїй здатності попереджувати реплікацію вірусу [Sangaev S., 2011].

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 РНКази 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. Дисертаційну роботу виконано у відділі генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, у рамках наукової бюджетної теми № III-1-15 «Вивчення фізіолого-біохімічних і молекулярно-біологічних особливостей функціонування та успадкування гетерологічних генів в рослинних системах» (№ держреєстрації 0115U000025).

Мета та завдання дослідження. Вивчення вірусостійкості трансгенних рослин родини Solanaceae з гетерологічними 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-α2b*, 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 РНКаз *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-α2b*).
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.

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 *N. bentamiana* з гетерологічним геном *ZRNase II* з цинії *Zinnia elegans* та *N. tabacum* 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. Імунноферментний 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).

Електронно-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. (ЦНДІ 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 12 наукових, науково-практичних конференціях та з'їздах: “*Bioresource and viruses*” September 9-11 2019, Kiev, Ukraine; *БИОТЕХНОЛОГИЯ XXI СТОЛЕТЬЯ* 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 КПП 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; IX Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» 24 квітня 2015 Київ; Біотехнологія: звернення та надії: збірник тез IV Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених 21-22 травня 2015 р., Київ. – К.: ВЦ НУБіП України, 2015.

Публікації. Результати досліджень опубліковані у фахових наукових журналах, а також у періодичних виданнях, які входять до наукометричних баз даних, збірниках наукових праць університетів і науково-дослідних інститутів. За темою дисертації опубліковано 19 наукових праць. 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. Дисертація складається зі списку умовних скорочень, анотації українською та англійською мовами, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, результатів досліджень та їх обговорення, узагальнення, висновків та списку використаних джерел, що містить 167 посилань. Дисертація викладена на 184 сторінках комп'ютерного друку і містить 10 таблиць та 40 рисунків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Огляд літератури є аналізом літературних джерел по використанню різних підходів для створення вірусостійких рослин. Описано механізми взаємодії між вірусами і рослинами, розглянуто наявні основні стратегії створення вірусостійких рослин. Охарактеризовано різні типи рибонуклеаз, які використовуються для підвищення вірусостійкості рослин різних видів і родів. Наведено характеристики вірусів, які використовувалися в представленому дослідженні та описано об'єкти дослідження. На основі проаналізованих даних зроблено узагальнення.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

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

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 [Murashige et al., 1962] та ½ MS. Після укорінення рослини розмножували живцюванням. Рослини вирощували у культиватійній кімнаті при температурі +24°C, 16-годинному світловому періоді, з інтенсивністю освітлення 4000 Люкс.

Культивування бактерій *Agrobacterium tumefaciens*. Бактерії *A. tumefaciens* культивували на середовищі LB [Bertani G., 1951] з додаванням антибіотиків карбеніцилін 100 мг/дм³ та рифампіцин 50 мг/дм³. Отриману бактеріальну культуру вирощували протягом 48 годин при температурі +27°C при постійному перемішуванні на шейкері. Після нарощування бактеріальні клітини осаджували, осад ресуспендували у розчині 10mM MgSO₄.

Генетичні конструкції, які були використані в роботі представлені на рисунку 1.

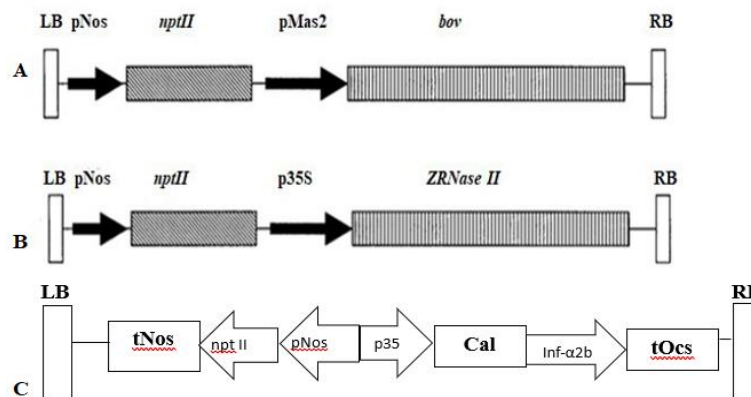


Рис. 1. Генетичні карти векторів pC27bov (A), pbi-RNS (B) та pCB124 (C). LB, RB – ліва та права фланкуючі послідовності pNOS, промотор нопалінсинтази; *npt II* – ген неоміцин фосфотрансферази; pMas2, конститутивний промотор маннопінсинтази 2; *bov* – послідовність кДНК гена панкреатичної рибонуклеази *Bos taurus*; 35S – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV), *ZRNase II* – ген S-подібної РНКаз з *Zinnia elegans*; *ifn-α2b* – ген інтерферону α2b людини (35S промотор і OCS термінатор), *cal* – лідерна послідовність апопластного таргетингу.

Генетична трансформація рослин. Листкові диски *N. benthamiana* механічно пошкоджували та інкубували в суспензії *A. tumefaciens* 30 хв., потім культивували на агаризованому середовищі MS. Через дві доби експланти переносили на MS з додаванням 500 мг/дм³ цефотаксиму та 100 мг/дм³ канаміцину в присутності фітогормонів BA 1 мг/дм³ та NAA 0,1 мг/дм³.

Генетичну трансформацію *N. tabacum* проводили за аналогічною схемою. Концентрація фітогормонів була: BA 0,05 мг/дм³, NAA 2,5мг/дм³.

Виділення загальної ДНК рослин. Загальну ДНК виділяли листків рослин з використання набору реактивів DNAPro100 «Neogene» виробництва України за інструкцією

фірми виробника.

Проведення полімеразної ланцюгової реакція. Для підтвердження присутності генетичних вставок генів 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 Taq-полімерази, 10-50 нг ДНК-проби. Загальний об'єм суміші становив 20 мкл. Послідовність праймерів представлена в таблиці 1.

Таблиця 1 Послідовність праймерів, використаних в роботі.

Ген	Праймери	Розмір ампліфікованого фрагменту, п.н.
<i>bov</i>	F 5'- atcatggctctgaagttccc-3' R 5'- cctacacagtagcatcaaaag-3'	450
<i>ZRNase II</i>	F 5'- acactcgaagcacacaacatgaaga-3' R 5'- gaatctagaaatttagaatgaagga-3'	720
<i>ifn-α2b</i>	F 5'-ttgatgctcctggcacag-3', R 5'-ttctgctctgacaacctc -3'	396
126 kDa TMV	F 5'-cgaactcatcggtggtat-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* було розроблено в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії з використанням програми FAST PCR. Умови проведення ампліфікації гена *ifn-α2b*: первинна денатурація +90°C, 3 хв; 30 циклів ампліфікації при +94°C по 30с - +60°C, 30с - +72°C, 30с. Остаточна полімеризація проводилась при +72°C протягом 5 хв.

Умови проведення ампліфікації для генів *bov* та *ZRNase II* були наступними: первинна денатурація +90°C 3 хв; 30 циклів ампліфікації при +94°C по 30с - +60 °C 30с +72°C. Остаточна полімеризація проводилась при +72°C протягом 5 хв.

Виявлення послідовностей мРНК генів RNS 3Т-ПЛР у трансгенних рослинах петунії. Для доведення транскрибування перенесених генів у трансформованих лініях петунії проводили 3Т-ПЛР. Синтез кДНК *Petunia*×*hybrida* 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.

Виявлення послідовностей мРНК TMV в інфікованих рослинах *N. tabacum*. ПЛР ампліфікацію вірусних генів проводили з рослин *N. tabacum* після інфікування. Реакційна суміш містила одноразовий ПЛР-буфер із сульфатом амонію, 0,2 мкмоль відповідних праймерів 200 мкмоль кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів, 0,5 од Taq-полімерази, 10-50 нг ДНК-проби. Загальний об'єм суміші становив 20 мкл. Для позитивного контролю використовували сумарну РНК нативного TMV. Умови ампліфікації: первинна денатурація – +94°C, 3 хв., 30 циклів амліфікації (+94°C, 30 сек – +62°C, 30 сек – +72°C, 30 сек.), заключний синтез – +72°C, 5 хв.

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 рослини висаджували в 36 лункові мікроплати з субстратом TS1 та накривали кришкою. Через 2-3 тижні кришку знімали, після акліматизації

рослини пересаджували в горщики. Умови в теплиці були наступні: температура +24°C, 16-годинний світловий період. Освітленість 20000 Люкс.

Інокуляція рослин вірусомісним матеріалом. Дослідні рослини інокулювали нативними вірусами, які були отримані на кафедрі вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» КНУ ім. Шевченка. Інокулювання рослин проводилось шляхом механічної скарифікації вірусомісного препарату в молоде листя рослин.

Визначення присутності вірусу в інфікованих рослинах та проведення імуноферментного аналізу (ІФА). Наявність вірусу в інфікованих рослинах визначали за візуальними симптомами вірусної інфекції. Присутність вірусів підтверджували використовуючи метод імуноферментного аналізу. Імуноферментний аналіз проводили використовуючи стандартний набір реактивів фірми «Loewe» та «Sigma», Німеччина дотримуючись інструкцій виробника. Дослідження проводили мікрометодом у 96-лункових планшетах Sarstedt (Німеччина).

Визначення вмісту продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та антиоксидантна активність (АОА) в інфікованих рослинах. Вміст продуктів ПОЛ визначали за допомогою вимірювання вмісту дієнових кон'югантів та малонового діальдегіду. Для визначення вмісту дієнових кон'югатів 1 г досліджуваного листового матеріалу розтирали в 5 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH 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. 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 при довжині хвилі 233 нм в кварцевих кюветах з ходом променю 10 мм.

Малоновий діальдегід 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. Після центрифугування 1 мл надосадової рідини переносили у пробірки і додавали по 1 мл 0,8% тіобарбітурової кислоти та 0,1 М фосфатного буфера (pH 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 при довжині хвилі 532 нм в кварцевих 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 $\text{Fe}^{2+}/\text{EDTA}$ 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.

Визначення загальної 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. Після центрифугування відбирали 0,5 мл гомогенату та додавали 0,9 мл тотальної РНК дріжджів розчинної в 0,1 М ацетатному буфері з pH 5,2. Суміш інкубували 30 хв при температурі +25°C. Після інкубації додавали 0,5 мл 25% HClO_4 та витримували 20 хв у холодильнику при +4°C до утворення осаду. Після утворення осаду суміш центрифугували 2500 об/хв 20 хв. Вимірювання оптичної щільності проводили на спектрофотометрі при довжинах хвилі 260 нм та 275 нм.

Розрахунок активності проводився за формулою:

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

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 загальної РНКазної активності проводили з використанням орцину [Jain A., 2020]. Для цього 400 мг листя рослин гомогенізували в охолоджену буфері 0,05 М трис HCl (pH 7,5) з додаванням 0,15 М NaCl та 1 мМ N-етилmaleїмїду. Загальний об'єм інкубаційної суміші становив 3 мл. Гомогенат

центрифугували 20 хвилин при 6000 об/хв. Аліквоти отриманих екстрактів використовували для визначення РНКазної активності. Для цього 0,5 мл екстракту інкубували в повторах 6 та 66 хвилин при $+31^{\circ}\text{C}$, відповідно. До повторів додавали 1 мл 34% HClO_4 та центрифугували 20 хвилин при 6000 об/хв. До розчину додавали 1 мл орцинового реактиву. Розчин охолоджували та вимірювали при довжині хвилі 670 нм.

Визначення особливостей розвитку системної вірусної реакції у рослин *N. benthamiana*, що експресують ген *ZRNase II*. Трансгенні рослини *N. 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 агробактаріальною суспензією, що містили векторну конструкцію pICH27566 та додатковою векторною конструкцією pICH 6692, яка містить супресор сайленсу. Схеми векторів представлені на рисунку 2 та 3.

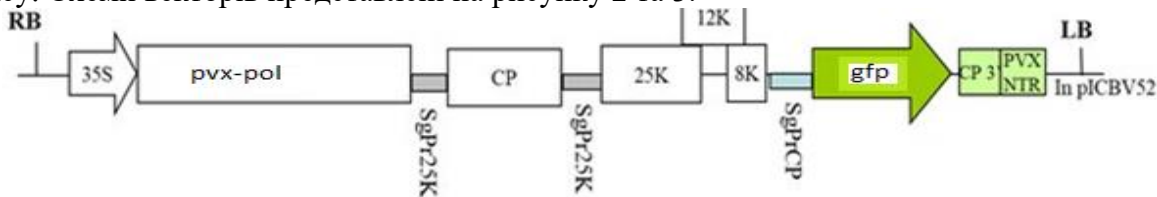


Рис. 2. Схема вектора pICH 27566: 35S-35S промотор CaMV; *pvx-pol* – ген PVX РНК полімерази; SgPr25K – субгеномний промотор PVX білка 25K; *cp* – ген білка оболонки PVX; 25k, 12k, 8k – гени, які кодують білки PVX 25K, 12K, 8K; SgPrCP – субгеномний промотор білка оболонки PVX; *gfp* – ген GFP; CP 3'-3' PVX; PVX NTR-3'UTR PVX.

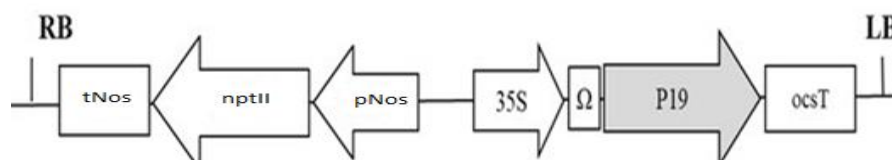


Рис. 3. Схема допоміжного вектора pICH 6692: 35S-35S промотор CaMV; Ω-5' омега нетрасуючий регіон; p19 – ген білка P19 (супресор сайленсингу); ocsT – термінатор октапін синтетази; pNos, tNos – промотор і термінатор нопалін синтази; *npt II* – ген ген *npt II*

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

Визначення співвідношення антоціанів до хлорофілів в рослинах *N. benthamiana*, що експресують ген *ZRNase II*. Для визначення співвідношення хлорофілів до антоціанів використовували портативний автоматичний аналізатор Opti-Sciences MPM-100.

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 змодельована типову спектрограму для рослин родини Solanaceae. Аналіз зразків проводили з використанням інфрачервоного спектрометра Nicolet IS50 ATR-FTIR spectrometer, Thermo Fisher, USA. За допомогою спеціального програмного забезпечення OMNIC Mercury GC Software, знімали показники фонових значень. Після отримання фонових графіків підготовлені зразки розміщували лицьовою стороною на поверхні оптичного вікна приладу та щільно притискали зажимним гвинтом. Після закріплення знімали показники зразків з використанням програми OMNIC Mercury GC Software. Після цього отримані спектрограми аналізували та проводили вимірювання площі піків за допомогою програми OMNIC 9.

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 (pH 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 $+4^{\circ}\text{C}$. 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 ультрамікромомі 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.

Визначення противірусної активності екстрактів рослин *N. tabacum* з геном *ifn-α2b*

Визначення противірусної активності екстрактів рослин з геном інтерферону проводили за пригніченням цитопатичної дії вірусу у субстратзалежній культурі перещеплювальних клітин тестикул поросят (ПТП). Як тест-вірус використовували вірус везикулярного стоматиту (ВВС), штам Indiana з інфекційним титром $4,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/0,1 \text{ мл}$ з музею кафедри вірусології НМАПО імені П.Л. Шупика МОЗ України. 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 у відповідні лунки планшетів вносили по 50 мкл тест-вірусу ВВС в інфекційній дозі 100 $\text{ТЦД}_{50}/0,05 \text{ мл}$.

Використовували наступні контролі (К-) – інтактні клітинні моношари і 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

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

Адосл. – розрахована активність інтерферону досліджуваного зразка;

А 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.

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.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

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. Рослини були трансформовані векторною конструкцією pCB124, яка містила в своєму складі ген *inf-α2b* людини. Встановлено, що оптимальним для регенерації пагонів було середовище MS яке містило фітогормони у концентрації $0,05 \text{ мг/дм}^3$ БА, $2,5 \text{ мг/дм}^3$ НАА. Частота регенерації на цьому середовищі становила 100%, а ефективність 5-7 новоутворених пагонів на експлант. ПЛР аналіз отриманих рослин показав наявність генетичної вставки гена *ifn-α2b*.

Дослідження по визначенню активності перенесеного гена інтерферону на культурі клітин показало, що у екстрактах трансгенних рослин інтерфероподібна активність варіювала від 3274 до 6312 МО/г маси.

Таблиця 2. Інтерфероподібна 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

Після визначення інтерфероподібної активності рослини *N. tabacum* інфікували вірусом TMV. 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 (рисунок 4).

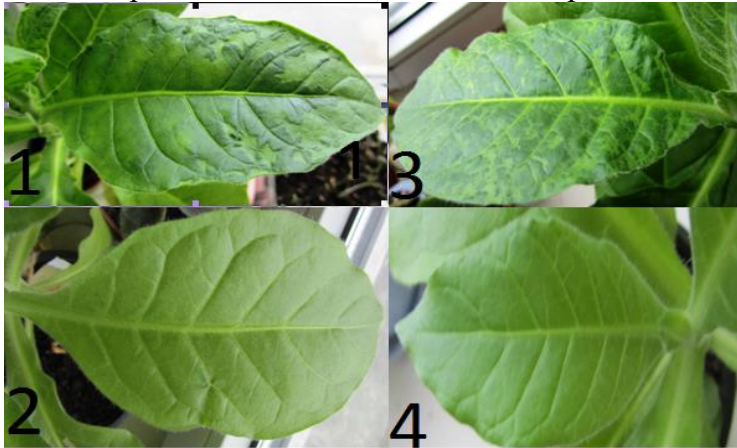


Рис. 4. Зовнішній вигляд листків рослин *N. tabacum* – контрольна інфікована рослина; 2 – контрольна неінфікована рослина; 3 – трансформована інфікована рослина; 4 – трансформована неінфікована рослина.

Одночасний 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. В результаті проведеного аналізу встановлено, що TMV дійсно був присутній в організмі *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*. Досліджуючи отримані зрізи з неінфікованих рослин, було виявлено характерні вакуолізовані клітини мезофілу. На діаметральних зрізах клітин в середньому виявлялося 12-13 хлоропластів. Їх строма характеризувалася слабо розвинутою внутрішньою мембранною системою. 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. Віріони були присутні у центральній вакуолі у вигляді розсіяних вірусних часток. Довжина окремих віріонів складала 300 ± 50 нм, з діаметром 16 ± 1 нм та діаметром центральної порожнини (просвіту) – 4 нм. 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 мультівезикулярними тілами (рисунок 5).

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

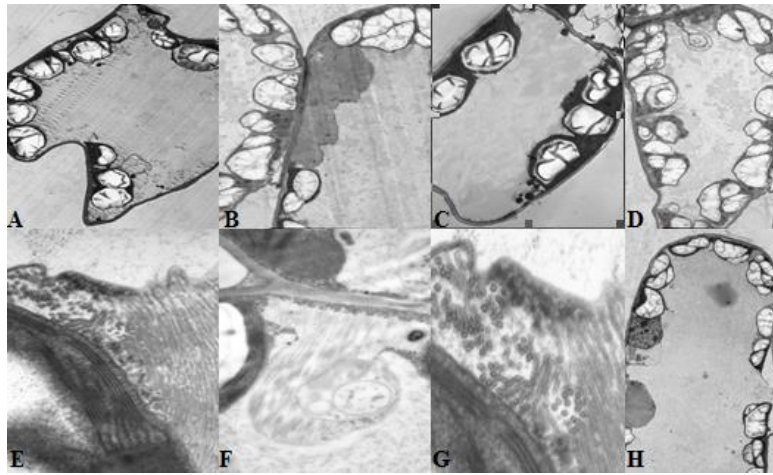


Рис. 5. Електронно-мікроскопічне дослідження ультраструктури клітин *N. tabacum*. А – ультраструктура клітини не інфікованої рослини дикого типу (збільшення 2К); В – ультраструктура клітини інфікованої рослини дикого типу (2К); 3 – ультраструктура клітини рослини з геном *ifn-α2b*, не інфікованої TMV (2К); D – ультраструктура клітини рослини з геном *ifn-α2b*, інфікованої TMV (2К); Е – вірусні агрегати в клітині рослини дикого типу (30К); F – формування везикулярного тіла в клітині інфікованої рослини дикого типу (20К); G – вірусні агрегати в клітині рослини з геном *ifn-α2b*, інфікованої TMV (80К); H – плазмоліз клітинної стінки в клітині дикого типу (2К)

Характерною ультраструктурною ознакою хлоропластів клітин інфікованих рослин було формування у стромі 2-3-х крохмальних зерен. В клітинах неінфікованих рослин, як контрольних так і трансгенних, було лише одне велике крохмальне зерно, що займало 81% площі перерізу органел.

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.

Оцінка розвитку стресових реакцій у інфікованих рослин *N. tabacum* виявила, що після інфікування вміст продуктів ПОЛ змінювався. В неінфікованих рослин дикого типу вміст дієнових кон'югатів (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 неінфікованих трансгенних рослинах вміст ДК становив 1,8±0,06 мкМ/мг, а в інфікованих 0,13±0,013 мкМ/мг. (рисунок 6)

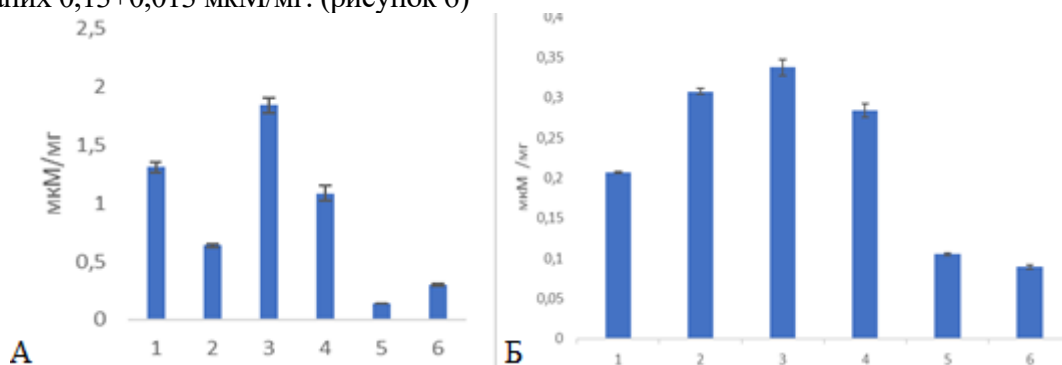


Рис. 6. Вміст дієнових кон'югатів (А) та малонового діальдегіду (Б) в рослинах *N. tabacum* (А) 1– неінфіковані рослини дикого типу; 2 – інфіковані рослини дикого типу; 3, 4 – неінфіковані рослини з геном *ifn-α2b*; 5, 6 – інфіковані рослини з геном *ifn-α2b*

В неінфікованих рослинах дикого типу вміст малонового діальдегіду (МД) склав 0,2±0,008 мкМ/мг. Після інфікування TMV вміст МД збільшився до 0,3±0,01 мкМ/мг. В трансгенних рослинах після інфікування вміст МД знижувався. Так, у неінфікованих трансгенних рослинах вміст МД становив 0,33±0,01 мкМ/мг, а після інфікування 0,08±0,002 мкМ/мг.

Результат дослідження загальної АОА показав (рисунок 7), що у рослин дикого типу АОА практично не змінювалась після інфікування. До інфікування активність була на рівні 58 мкМ МД/г

сирої маси, а після – 56 мкМ МД/г залишкового малону.

В трансгенних рослинах після інфікування АОА підвищувалася. У неінфікованих трансгенних рослинах АОА становила 43,7±0,12 мкМ/мг, а після інфікування 48±0,12 мкМ/мг.

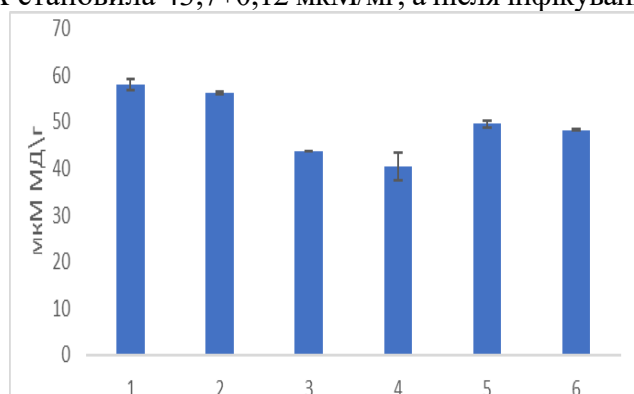


Рис. 7. Атиоксидантна активність у рослинах *N. tabacum*. 1– неінфіковані рослини дикого типу; 2 – інфіковані рослини дикого типу; 3, 4 – неінфіковані рослини з геном *ifn-α2b*; 5, 6 – інфіковані рослини з геном *ifn-α2b*.

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.

Таким чином методом агробактеріальної трансформації були отримані трансгенні рослини *N. tabacum* з геном *ifn-α2b*. В цих рослинах було підтверджено наявність цільового гена. Білковий продукт гена *ifn-α2b* був активний проти вірусу везикулярного стоматиту на культурі клітин ПТП. Однак, незважаючи на виявлену противірусу 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 рослин не було виявлено змін ультраструктури клітин порівняно з контролем. Встановлено, що ген *ifn-α2b* не впливав на розвиток інфекції викликаною TMV. Для досягнення цілей роботи подальші дослідження проводили з використанням інших гетерологічних генів, а саме рибонуклеаз. Було досліджено рослини *S. tuberosum*, *Petunia × hybrida* та *N. benthamiana*.

Дослідження трансгенних рослин *S. tuberosum*. Трансгенні рослини *S. tuberosum* з генами *ZRNase II* та *bov* 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 (додатковий вірусотолерантний контроль). ПЛР аналіз зразків *S. tuberosum* підтвердив наявність генів інтересу.

Рослини були адаптовані до тепличних умов. Частота проростання з мікробульб склала 90%.

Аналіз загальної активності РНКаз виявив (рисунок 8), що загальна РНКазна активність усіх досліджуваних вихідних рослин дикого типу була на рівні 10-11 умовних одиниць.

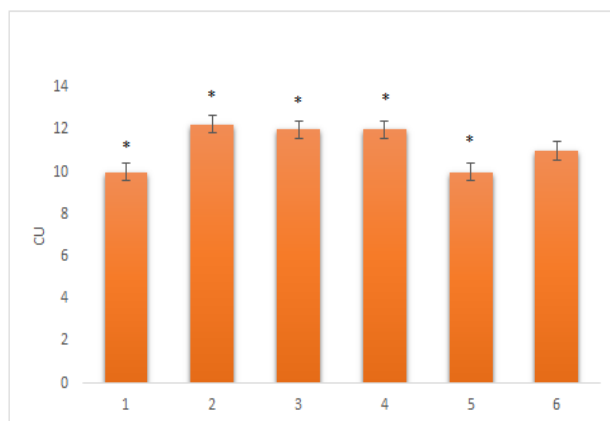


Рис 8. Загальна активність РНКаз в екстрактах листя *S. tuberosum*. 1 – рослина сорту Лугівська; 2 – трансформовані рослини сорту Лугівська з геном *ZRNase II*; 3 – трансформовані рослини сорту Лугівська з геном *bov*; 4 – трансформовані рослини сорту Ласунак з геном *bov*; 5 – рослина сорту Ласунак; 6 – рослина сорту Слов'янка; CU – умовна одиниця, * $P \leq 0,05$.

Виявлено, що серед вихідних сортів, вірусотолерантний сорт Слов'янка мав найвищий рівень активності РНКази. Серед трансгенних рослин найбільшу активність мали екстракти з 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. Такими чином встановлено, що генетична трансформація призводила до змін активності РНКази в рослинах.

Після аналізу загальної РНКазої активності проводили інфікування рослин вірусом PVY. Через три тижні після інокуляції рослин вірусом у контрольних рослинах спостерігали ознаки вірусної інфекції (рисунок 9, 10). Симптоми інфекції PVY включали: скручування нижніх листків, утворення жовтих плям на листі, некрози стебел і жилок, концентричні некрози на листках, затримку росту.

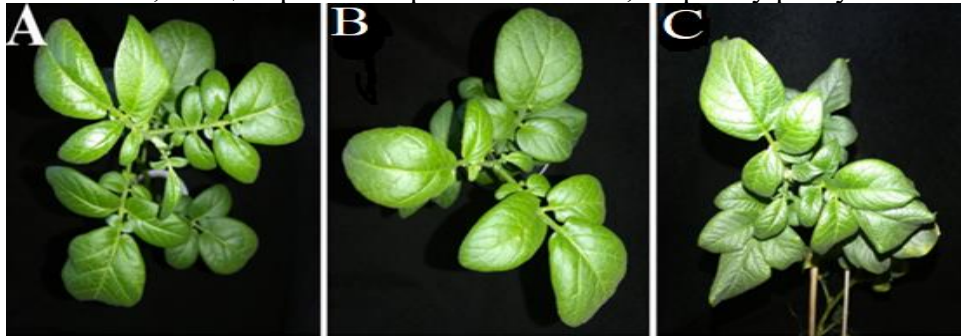


Рис. 9. Симптоми, викликані PVY на листках рослин картоплі сорту Лугівська. А – трансгенна рослина з геном *ZRNase II*, інокульована буфером; В — трансгенна рослина з геном *ZRNase II*, інокульована PVY; С – рослина дикого типу, інокульована PVY.



Рис. 10. 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.

У трансгенних рослин виявлено, що прояви вірусної хвороби були менші порівняно з рослинами дикого типу. Трансгенні рослини Ласунак з геном *ZRNase II* продемонстрували відстрочені та менш виражені симптоми, а в трансгенних рослинах сорту Лугівська з геном *ZRNase II* симптоми були виявлені лише на 25-30 день після зараження.

У трансгенних рослин сортів Лугівська та Ласунак з геном *bov* розвиток симптомів спостерігали на два тижні пізніше, ніж в контрольних рослинах відповідних сортів. Візуально симптоми були більш виражені ніж у рослин з геном *ZRNase II*

Визначення вірусних антигенів методом ІФА показало дещо нижчий рівень накопичення антигенів PVY у рослинах вірусостійкого сорту Слов'янка порівняно з іншими представленими сортами (рисунок 11).

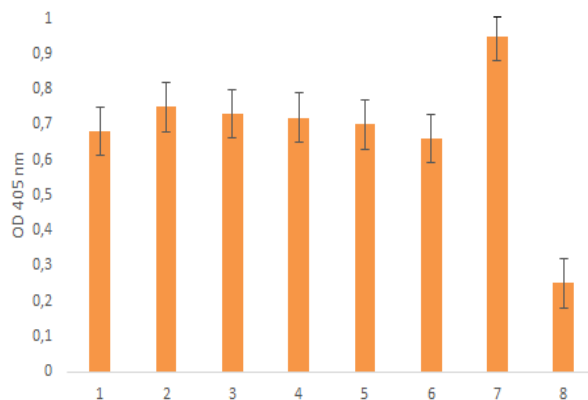


Рис. 11. Результати сендвіч ІФА екстрактів рослин *S. tuberosum*

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.

Отримані дані співвідносяться з заявленими сортовими характеристиками сортів. 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, 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*.

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

Дослідження трансгенних рослин *Petunia×hybrida*. Трансгенні сорти *Petunia×hybrida* M1 та P5, що містили в своєму геномі цільовий ген *ZRNase II* рослин були депоновані в колекції трансгенних рослин ІБГІ. Проведений ПЛР аналіз показав наявність вставки гена *ZRNase II* в досліджуваних рослинах (рисунок 12).

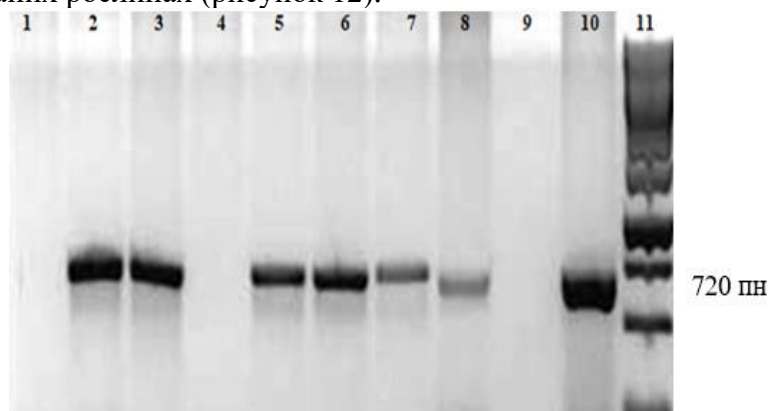


Рис 12. Електрофореграма продуктів ПЛР з праймерами, специфічними до гена *ZRNase II* в рослинах *Petunia×hybrida*. 1– нетрансгенна рослина M1; 2, 3 – трансгенні лінії M1; 4 – нетрансгенна рослина P5; 5-8 – трансгенні лінії P5; 9 – негативний контроль, без ДНК; 10 – позитивний контроль, плазмідна ДНК; 11 – маркер молекулярної маси

Щоб впевнитися у відсутності явища мовчання генів, було відібрано рослини для проведення ЗТ-ПЛР. Показано, що всі дослідні зразки мали в своєму геномі активний ген *ZRNase II*.

Акліматизація рослин до тепличних умов дозволила отримати повністю адаптовані

рослини. Ефективність акліматизації склала 85-90%.

Перед інфікуванням рослин визначали загальну РНКазну активність (рисунок 13).

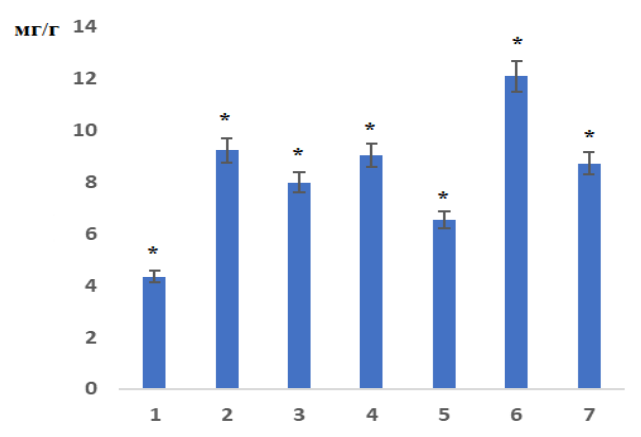


Рис. 13. Загальна активність РНКаз в екстрактах листя *Petunia x hybrida*.

1, 5 – контрольні нетрансформовані рослини P5 та M1, відповідно; 2-4 – трансгенні лінії сорту P5; 6-7 – трансгенні лінії сорту M1 * $P \leq 0,05$.

Виявлено, що 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, а у трансгенних лініях сорту M1 в 1,34-1,85 рази.

Після визначення загальної РНКазної активності рослини петунії були інфіковані TMV. На третій тиждень після інокуляції на верхніх листках рослин дикого типу спостерігали ознаки вірусного ураження: мозаїку на листі, крапчастість, деформація листкових пластинок (рисунок 14). Симптоматична картина відрізнялася в залежності від сорту. Листя сорту M1 мали виражені симптоми інфекції у той же час листя сорту P5 не виявили яскравих ознак вірусної інфекції.



Рис 14. Візуальні ознаки TMV в рослинах *Petunia x hybrida*. Відокремлені листки петунії. а, b – сорт M1 не інфікований та b – інфікований, відповідно; c – інфікована трансгенна рослина сорту M1; Розвиток симптомів вірусної інфекції на інфікованих контрольних нетрансформованих рослинах петунії M1 (d) та трансгенних рослинах M1 (e)

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

За результатами ІФА виявлено (рисунок 15), що інфіковані трансгенні рослини сорту M1 мали нижчі рівні накопичення вірусного антигена, ніж інфіковані рослини дикого типу даного сорту. Різниця склала 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.

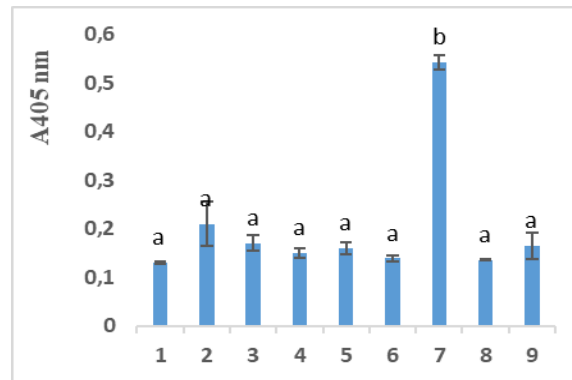


Рис. 15. Результати непрямого ІФА екстрактів рослин *Petunia*×*hybrida*. 1, 6 – інокульовані буфером рослини дикого типу сортів Р5 та М1 відповідно; 2, 7 – інокульовані ТМВ рослини дикого типу сортів Р5 та М1, відповідно; 3-5 – інокульовані ТМВ трансформовані лінії петунії сорту Р5; 8-9 – трансформовані лінії петунії сорту М1. Однаковими літерами позначені стовпчики без істотних відмінностей.

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

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.

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, рівень накопичення ДК був значно вищий, та становив 0,4–0,45 мкгМ/мг. В той же час в групі рослин, які були інфіковані ТМВ, вміст ДК як в трансгенних лініях, так і у вихідних рослинах підвищувався порівняно з не інфікованими рослинами. Після інфікування в окремих трансгенних лініях сорту Р5 вміст ДК підвищувався в 2,2 рази 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 рослинами дикого типу.

У трансформованих не заражених рослинах, за виключенням двох ліній, активність ПОЛ була на рівні контрольних не заражених рослин дикого типу. 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 16)

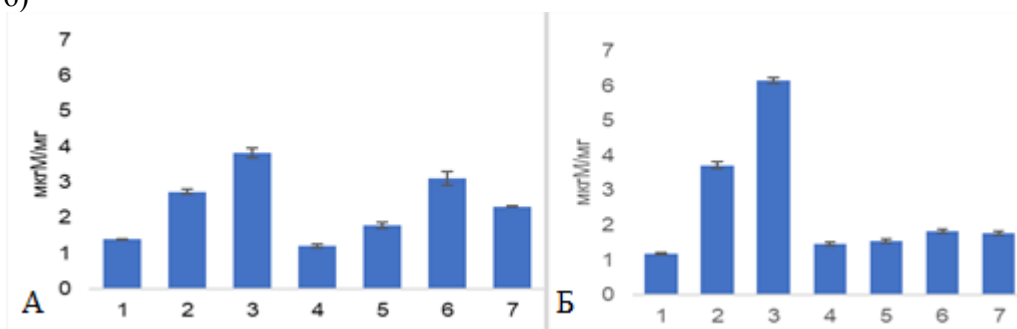


Рис. 16. Вміст МД в неінфікованих (А) та інфікованих (Б) рослинах *Petunia*×*hybrida*. 1, 5 – нетрансформовані контрольні рослини сорту Р5 та М1, відповідно; 2-4 – трансгенні лінії сорту Р5; 6-7 – трансгенні лінії сорту М1.

Після інфікування ТМВ 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.

При дослідженні АОА показано (рисунок 17), що до інфікування контрольні рослини мали відносно високу АОА, яка складала 9,5 мкМоль/г. В листових екстрактах трансгенних рослин

P5T1 та M1T1 спостерігали меншу АОА, близько 23,4-25,4 мкМД/г. Інші трансгенні ліній мали активність на рівні 12,0-13,3 мкМД/г.

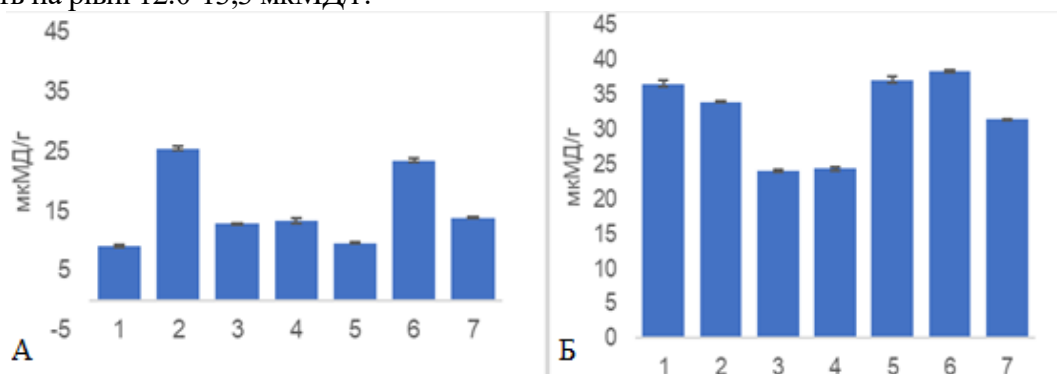


Рис. 17. АОА в неінфікованих (А) та інфікованих (Б) рослинах *Petunia*×*hybrida*. 1, 5 – нетрансформовані контрольні рослини сорту Р5 та М1, відповідно; 2-4 – трансгенні лінії сорту Р5; 6-7 – трансгенні лінії сорту М1.

Водночас в групі рослин, які були інфіковані TMV, 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 величин, а у лінії М1Т2 АОА була більшою на 18%, ніж у контролі.

Досліджувані трансгенні рослини відрізнялись від рослин дикого типу вищим рівнем АОА, що є свідченням їх підвищеної здатності до адаптації у відповідь на розвиток стресу.

Таким чином, у 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 *ZRNase II*. Однак, наявні сорти петунії не проявляли чіткої системної реакції, тому було вирішено розробити спеціальну модельну систему на основі рослин *N. benthamiana*.

Дослідження трансгенних рослин *N. benthamiana*. Рослини *N. benthamiana* були введені у культуру *in vitro* шляхом поверхневої стерилізації насіння.

Генетична трансформація рослин *N. benthamiana*. Листкові диски *N. benthamiana* трансформували штамом *AGL0 A. tumefaciens*, що містить вектор pbi-RNS. На регенераційному агаризованому для рослин тютюну було притаманне утворення пагонів на вихідних експлантах зі 100% частотою (рисунок 18). Відокремлені від вихідних експлантів пагони переносили на селективне середовище для відбору трансформованих рослин.

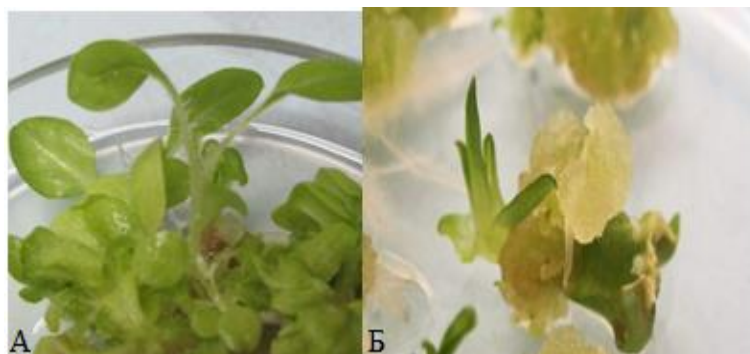


Рис. 18. Регеновані пагони *Nicotiana benthamiana*:

а – регеновані рослини; б – регенерація рослин з калюсної культури.

Отримані рослини фенотипово не відрізнялися від контрольних рослин.

Після селектування рослин проводи ПЛР аналіз (рисунок 19). Аналіз *N. benthamiana* показав, що у всіх досліджуваних зразках була наявна генетична вставка гена *ZRNase II*.

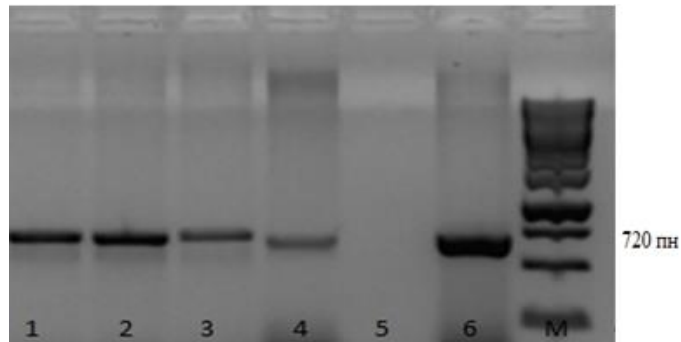


Рис. 19. Електрофореграма продуктів ПЛР з праймерами специфічними до гена *ZRNase II* в рослинах *N. benthamiana*.

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

Виокремлено 4 незалежні окремі лінії.

При дослідженні загальної РНКазної активності в рослинах *N. benthamiana* з геном *ZRNase II* було встановлено, що контрольні рослини мали значно вищий рівень активності (рисунок 20).

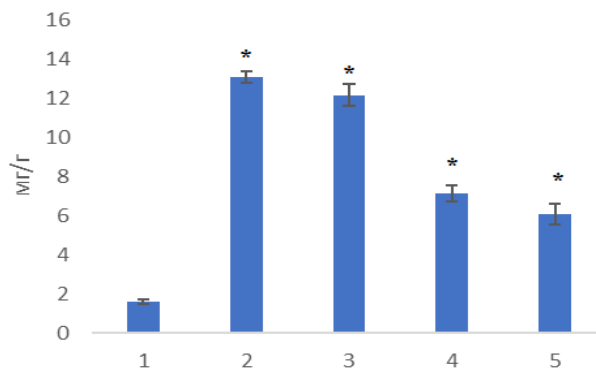


Рис. 20. Загальна активність РНКаз в екстрактах листа *N. benthamiana*: 1 – контрольні рослини дикого типу; 2-5 – лінії з геном *ZRNase II* * $P \leq 0,05$.

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 *ZRNase II* призводила до збільшення рівня активності РНКаз порівняно з рослинами дикого типу.

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* (рисунок 21). Продукт цього гена здатен флуорескувати в ультрафіолетовому спектрі, що дозволяє візуально оцінити розповсюдження вірусу по рослині у реальному часі.

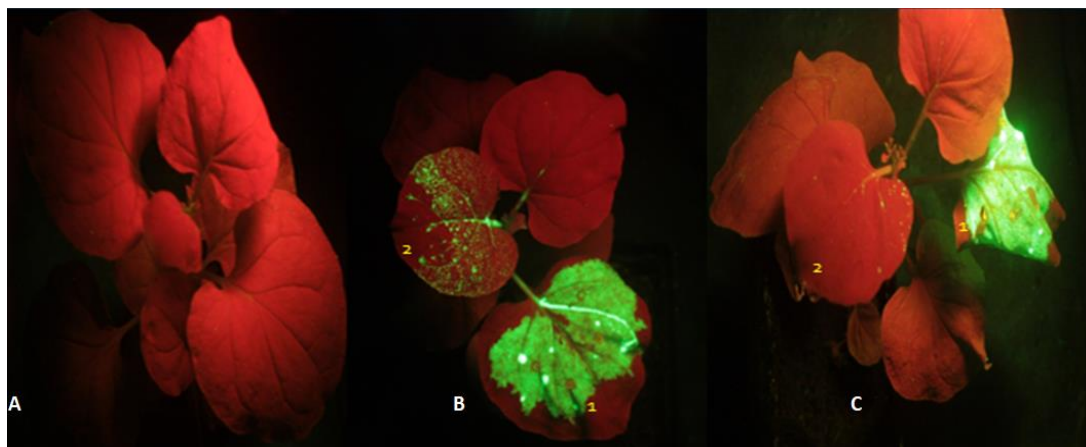


Рис. 21. Флуоресценція GFP в рослинах *N. benthamiana* через 3 тижні після агроінфільтрації векторними конструкціями pICH 27566 та pICH 6692.

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. 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. Встановлено, що у трансгенних лініях розвиток системної вірусної реакції був змінений. Незважаючи 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 у контролі. В цих рослинах GFP детектували у листі другого і третього ярусів відносно зони первинної інфільтрації. У 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.

Використовуючи портативний прилад Opti-Sciences MPM-100, було проаналізовано вміст хлорофілів, антоціанів та їх співвідношення після ураження. Аналіз результатів показав, що вміст хлорофілу підвищувався в усіх інфікованих рослинах у 1.5 рази. Підвищення вмісту хлорофілів було притаманне як для рослин дикого типу, так і для трансгенних ліній. Також було виявлено, що у інфікованих трансгенних рослинах кількість антоціанів знижувалася в 2-2.5 рази у порівнянні з неінфікованим контролем та в 1,5 раз у порівнянні з інфікованим контролем. 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 (рисунок 22).

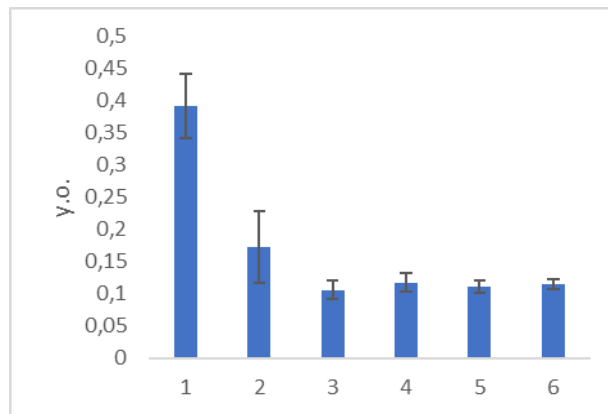


Рис. 22. Співвідношення антоціанів до хлорофілів в рослинах *N. benthamiana* після агроінфільтрації векторними конструкціями pICH 27566 та pICH 6692: 1 – не інфіковані рослини дикого типу; 2 – інфіковані рослини дикого типу; 3-6 – трансгенні лінії *N. benthamiana*.

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* призводила до зміни стійкості до дії біотичного стресу, викликаного вірусною інфекцією.

Паралельно проводили ІЧ спектроскопію неінфікованих трансгенних рослин. Оскільки клітинні стінки рослини складаються з целюлози, для вирішення проблеми різниці між товщиною, ступеню розвитку та кількості дрібних жилок в цільних листків досліджуваних варіантів використовували відносні показники (нормовані 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, фенілпропанолів, фітофенолів.

Дані аналізу вказують, що експресія рибонуклеаз у листках трансгенних рослин

позначається на первинному метаболізмі (рисунок 23).

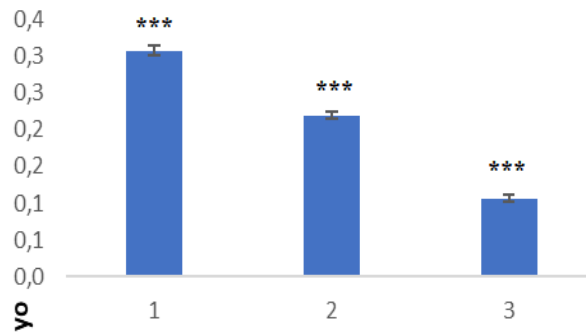


Рис. 23. Співвідношення Амід II/Амід I в рослинах *N. benthamiana*.

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. Вміст вторинних метаболітів (ліпідів, полісахаридів та фенілпропаноїдів) залишається сталим.

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 24).

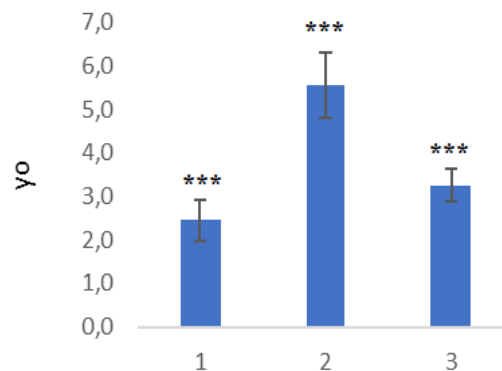


Рис.24. Вміст нуклеїнових в рослинах *N. benthamiana*.

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

Таким чином 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 відбуваються зміни в білковому складі та загальній кількості нуклеїнових кислот, що можливо є проявом впливу трансформації рослин геном *ZRNase II*. Отже, використання даного гену є перспективним напрямком для подальших досліджень пов'язаних зі створенням вірусостійких рослин.

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 РНКази в трансгенних рослинах *N. benthamiana* відбувається конформаційна перебудова білкових структур в бік формування більшої кількості бета складчастих доменів.

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. **Потрохов А. О.** Антиоксидантна активність трансгенних рослин *Nicotiana tabacum* L з геном *ifn-α2b* людини, інфікованих вірусом тютюнової мозаїки наук. Зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол. 2015, № 2(63) С58-64. (Здобувачем проведено огляд літератури та проаналізовано антиоксидантну активність екстрактів трансгенних рослин *Nicotiana tabacum* L з геном *ifn-α2b*, написано статтю та зроблено висновки) (Категорія Б)
2. **Потрохов А. О.**, Зубр З. В., Трохименко О. П., Матвієєва Н. А. Оцінка протівірусної 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 (Здобувачем були підготовлені та отримані екстракти трансгенних, написано основну частину статті та зроблено висновки.) (Категорія Б)
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 (Здобувачем проведено огляд літератури та проаналізовано антиоксидантну активність екстрактів трансгенних рослин написано основну частину статті та зроблено висновки) (Категорія А)
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 (Здобувачем був проведений аналіз наукової літератури та написано основну частину статті) (Категорія А)
5. **Potrokhov A.**, D. Klymchuk, Yu. Akimov, N. Matvieieva, E. Trokhimenko, I. Dzubylyk, 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 (Здобувач отримав вихідний матеріал рослин, та прийняв участь у проведенні досліджень, написанні основного тексту статті та формулюванні висновків.)
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; (Здобувач провів відбір матеріалу, прийняв участь у проведенні досліджень, написанні тесту статті та формулюванні висновків.)
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; (Здобувач провів відбір матеріалу, прийняв участь у проведенні досліджень, написанні тесту статті та формулюванні висновків.)
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., **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. Протівірусна дія екстрактів з бородатих коренів рослин, що мають ген інтерферону- $\alpha 2b$ людини. ІХ Всеукраїнська науково-практична конференції «Біотехнологія XXI 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. Протівірусна 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.

АНОТАЦІЯ

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20. біотехнологія. – Національний технічний університет України “Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського”, Київ, 2024.

У роботі наведено результати дослідження вірусостійкості трансгенних рослин родини Solanaceae з різними гетерологічними генами. Досліджувалися рослини *Nicotiana tabacum* з геном *inf-α2b*, *Solanum tuberosum* з генами *ZRNase II* та *bov*, *Petunia×hybrida* з геном *ZRNase II* та *N. benthamiana* з геном *ZRNase II*. Рослини були перевірені на наявність цільових генів, інфіковані вірусами рослин та проаналізовані за низкою біохімічних і вірусологічних параметрів.

Використані у роботі рослини *Nicotiana tabacum* та *N. benthamiana* було введено в асептичну культуру шляхом поверхневої стерилізації насіння. Генетичну трансформацію цих рослин було проведено за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*. Рослини *S. tuberosum* та *Petunia×hybrida* були взяті з колекції трансгенних рослин Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

В рослинах *Nicotiana tabacum* з геном *inf-α2b* було визначено інтерфероподібну активність на культурі клітин. Показано, що незважаючи на активність інтерферону на культурі клітин, ці рослини не мали стійкості до вірусу рослин. Однак, не було виявлено змін в ультраструктурі клітин між трансгенними рослинами і рослинами дикого, окрім того ці трансгенні рослини були більш адаптовані до біотичного стресу.

У трансгенних рослин *S. tuberosum*, *Petunia×hybrida* та *N. benthamiana* було встановлено підвищену загальну РНКазну активність. Після інфікування трансгенних рослин та перевірки їх за рядом вірусологічних параметрів було виявлено, що використання генів рибонуклеаз дозволяє змінювати вірусостійкість рослин. Показано, що експресія в рослинах гена *ZRNase II* приводить до більш вираженого уповільнення розповсюдження вірусу по рослині ніж гена *bov*.

Таким чином, рослини різних видів родини Solanaceae з генами рибонуклеаз проявляли змінений характер стійкості до інфікування вірусами.

Ключові слова: генетична трансформація, інтерферон, рибонуклеази, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Petunia×hybrida*, *N. benthamiana*, віруси рослин.

SUMMARY

Potrokhova A.O. Determination of virus resistance of transgenic plants of the Solanaceae family, transformed with heterologous genes - Copyright of the manuscript.

Dissertation for obtaining the scientific degree of candidate of biological sciences by specialty 03.00.20. biotechnology. - National Technical University of Ukraine "Ihor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute", Kyiv, 2024.

The paper presents the results of the study of virus resistance of transgenic Solanaceae plants with various heterologous genes. *Nicotiana tabacum* with the *inf-α2b* gene, *Solanum tuberosum* with the ZRNase II and *bov* genes, *Petunia*×*hybrida* with the ZRNase II gene and *N. benthamiana* with the ZRNase II gene were studied. All plants were screened for target genes and infected by plant viruses.

N. tabacum and *N. benthamiana* plants were introduced into aseptic culture by surface sterilization of seeds. Genetic transformation of these plants was carried out using *Agrobacterium tumefaciens*. *S. tuberosum* and *Petunia*×*hybrida* plants were taken from the collection of transgenic plants of the Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine.

The interferon-like activity on cell culture was determined in *N. tabacum* plants with the *inf-α2b* gene. It was shown that despite the activity of interferon on cell culture these plants did not have resistance to the plant virus. However, according to biochemical reactions of LPO and AOA these transgenic plants were more adapted to biotic stress caused by TMV infection.

It was shown the increased total RNase activity in transgenic plants *S. tuberosum*, *Petunia*×*hybrida* and *N. benthamiana*. It was found that ribonuclease genes allow changing the virus resistance of plants. It was shown that the expression of the ZRNase II gene in plants leads to a more pronounced slowing down of the spread of the virus throughout the plant than the *bov* gene.

Thus, plants of various species of the Solanaceae family with ribonuclease genes showed a changed nature of resistance to virus infection.

Key words: genetic transformation, interferon, ribonucleases, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Petunia*×*hybrida*, *N. benthamiana*, plant viruses.