

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра вірусології

Зав. кафедри: професор, д.б.н. Будзанівська І. Г.

Протокол №____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 20__ р.

**Особливості розвитку системних вірусних реакцій в рослинах
Nicotiana benthamiana, які експресують гетерологічну РНКазу**

Кваліфікаційна робота магістра

денної форми навчання

за спеціальністю біологія

Серажим Ангеліни Юліанівни

Науковий керівник від кафедри

Будзанівська І. Г.

Робота виконана на базі «Інституту клітинної біології та генетичної інженерії» НАН України під керівництвом к.б.н. Овчаренко О.О.

Оцінка захисту роботи

Київ – 2024 р.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	7
1.1 Вірус тютюнової мозаїки та його характеристика.....	7
1.2 Вплив вірусів на рослини.....	10
1.3 Стратегії боротьби з вірусами за допомоги трансгенних рослин.....	12
1.4 РНКазы та їхня роль в клітинах рослин.....	16
1.5 <i>Nicotiana benthamiana</i> як модельна система.....	19
1.6 Вірусні системи експресії та використання GFP.....	19
1.7 Вірусні вектори.....	20
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи дослідження	22
2.1 Рослинний матеріал.....	22
2.2 Використані реактиви.....	22
2.3 Культивування рослинного матеріалу <i>in vitro</i>	23
2.4 Акліматизація рослин до тепличних умов.....	24
2.5 Стерилізація рослинного матеріалу.....	25
2.6 Вимірювання рибонуклеазної активності.....	25
2.7 Візуальна діагностика рослин.....	27
2.8 Проведення непрямого ІФА.....	27
2.9 Культивація бактерії.....	29
2.10 Агробактеріальна інфільтрація.....	30
2.11 Інфікування рослинного матеріалу вірусом тютюнової мозаїки.....	31
2.12 Розщеплення в поколіннях.....	31
РОЗДІЛ 3. Результати та їх обговорення	33
3.1 Культивування рослинного матеріалу та акліматизація.....	33
3.2 Загальна рибонуклеазна активність.....	34
3.3 Дослідження системного вірусного транспорту в рослинах <i>N. benthamiana</i> трансформованих геном <i>ZRNase II</i>	36

3.4 Розщеплення в поколіннях.....	38
3.5 Візуальна діагностика.....	39
3.6 Проведення непрямого ІФА.....	41
ВИСНОВКИ.....	43
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	44

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ:

MS - Мурасіге-Скуга;

РНКаза — рибонуклеаза;

CP — capsid protein (капсидний білок);

LB — lysogenic broth (лізогенний бульон);

MP — movement protein (білок руху).

ВСТУП

Вплив вірусних захворювань на врожайність та якість продукції сільськогосподарських культур є однією з ключових проблем у галузі сільського господарства. Здатність вірусів викликати епіфітотії в рослинах може суттєво погіршити продовольчу безпеку та стан економіки сільського господарства як в Україні, так і в усьому світі. “Санітарні” методи є одними з найпоширеніших, що включають видалення уражених рослин та миття рук між кожною посадкою, також дотримання сівозміни.[43] Щорічно з’являються нові підходи боротьби з вірусними захворюваннями. Наприклад, є дослідження єгипетських вчених, які визначили пряму дію та противірусний захисний ефект, опосередкований активацією імунної системи рослин наночастинками оксиду нікелю проти вірусу огіркової мозаїки (ВОМ).[42] Одним із можливих підходів до боротьби з вірусними захворюваннями є використання гетерологічних РНКаз у рослинах. Це відкриває нові можливості для створення стійких до вірусів сортів та підвищення продуктивності сільськогосподарських культур.

Для розуміння та вивчення особливостей розвитку системних вірусних реакцій в рослинах *Nicotiana benthamiana*, які експресують гетерологічну РНКазу, проводять комплексні дослідження. Мета роботи полягає у вивченні молекулярних механізмів взаємодії між гетерологічними екстраклітинними рибонуклеазами та вірусами, а також у дослідженні впливу цих реакцій на стійкість рослин до вірусних інфекцій та їх продуктивність.

Завдання поставлені у цій роботі:

1. Виростити та акліматизувати трансгенні рослини *Nicotiana benthamiana* для подальших маніпуляцій.

2. Інфікувати вирощені рослини вірусом тютюнової мозаїки.
3. Порівняти вплив експресії гетерологічних рибонуклеаз, на поширення маркерного білка gfr в складі конструкції для вірусної експресії.
4. Порівняти накопичення вірусних антигенів контрольні рослини з трансгенними рослинами лініями *Nicotiana benthamiana*, після інфікуванням ВТМ.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Вірус тютюнової мозаїки та його характеристика

Вірус тютюнової мозаїки (ВТМ; рід *Tobamovirus*; родина *Virgaviridae*) - це одноланцюговий позитивний РНК-вірус. Геном ВТМ кодує три важливі білки: білки-компоненти реплікази (RP; 130 кДа і 180 кДа), необхідні для транскрипції та реплікації вірусу, білок руху (MP; 30 кДа), який відповідає за переміщення вірусу від клітини до клітини, і білок оболонки (CP; 17,5 кДа), необхідний для формування оболонки вірусу.

Зокрема, послідовність розміром 130 кДа містить метилтрансферазу та РНК-геліказу, що відповідають за різні функції в реплікації та транскрипції РНК. У свою чергу, послідовність розміром 180 кДа містить ті ж самі функціональні ділянки, але додатково включає РНК-залежну РНК-полімеразу, що відповідає за копіювання РНК-вірусу. Це свідчить про значну функціональну різноманітність геному цього вірусу. Ці білки відіграють критичну роль у життєвому циклі вірусу та його взаємодії з клітинами рослин. Наприклад, білки-компоненти реплікази необхідні для створення нових копій вірусу, білок руху дозволяє йому активно переміщатися в організмі рослини, а білок оболонки формує зовнішню оболонку вірусу, що є ключовим для його захисту та розповсюдження. Така комплексність в будові та функціональності геному свідчить про складну адаптацію цього вірусу до життєвого циклу рослин та його ефективність у зараженні та розповсюдженні в рослинній тканині.[1, 23]

Частинки ВТМ - це палички розміром 300 нм × 18 нм, вони високопатогенні та стійкі. Білки розташовані спіралью, створюючи в цілому

130 витків. Крім того, капсид включає 2130 протомерів, що кожен складається з 158 амінокислотних залишків. Така складна структура дозволяє утворювати коротші віріони шляхом інкапсуляції субгеномної РНК.

Ці віріони, які виробляє вірус тютюнової мозаїки, мають унікальну властивість утворювати великі кристалічні масиви, які можна спостерігати при світловій мікроскопії. Надзвичайна стабільність ВТМ дозволяє йому залишатися інфекційним після довгого періоду зберігання, навіть до 50 років при 4°C, і виживати в сухому листі тютюну протягом 52 років, залишаючись активним навіть після значного розведення. Проте, термічна обробка при температурі 90°C протягом 10 хвилин може інактивувати цей вірус.

Особливо важливо враховувати, що рослини, які заражені ВТМ, не піддаються лікуванню, тому їх потрібно видаляти, щоб запобігти подальшому поширенню вірусу та зменшити збитки, які він може заподіяти сільському господарству та продовольчій безпеці. Таким чином, ВТМ представляє серйозну загрозу для аграрної сфери [2, 3, 4, 5, 24].

Вірус тютюнової мозаїки є одним з найбільш шкідливих і поширених вірусів. Вірус вражає більшу частину рослин сімейства Пасльонові, викликаючи вирости на листках, некроз плодів та мозаїку. Вірус передається від хворої рослини до здорової та через насіння. ВТМ дуже легко передається механічно, коли заражений листок треться об лист здорової рослини, через забруднені інструменти, а іноді через працівників, руки яких заражені ВТМ після куріння сигарет. Пошкоджена рослинна клітина є місцем проникнення ВТМ. Вірус також може заражати оболонки насіння, і рослини, що проросли з цього насіння. ВТМ проникає в рослинну клітину через незначні рани. Як тільки ВТМ потрапляє в клітину, частинки вірусу організовано розкладаються, щоб відкрити РНК ВТМ. Вірусна РНК є позитивною, і

служить безпосередньо як інформаційна РНК (мРНК), яка транслюється за допомогою рибосом господаря. [25, 26, 27]

ВТМ використовує свій руховий білок для поширення від клітини до клітини через плазмодесми, що з'єднують рослинні клітини. Зазвичай плазмодесми занадто малі для проходження цілих частинок ВТМ. [26, 27].

Білок руху модифікує отвори плазмодесми, щоб РНК вірусу могла розповсюджуватися до сусідніх клітин. Коли вірус переміщується від клітини до клітини, він зрештою досягає судинної системи рослини для швидкого систематичного поширення через флоему до коренів і кінчиків рослини.

Цикл розвитку ВТМ та його епідеміологія тісно пов'язані, оскільки розмноження та поширення вірусу повністю залежить від вірусу та стану господаря. Існують значні варіації у захворюваності залежно від часу появи хвороби на полі та практики вирощування культур. Наприклад, деякі рослини можуть бути інфіковані на початку сезону або через залишки вірусних частинок ВТМ на насіннєвій оболонці, або через механічне зараження рослин при культивуванні. Потім хвороба може швидко поширюватися по полю чи теплиці через контакт інфікованих ВТМ рослин зі здоровими рослинами, або через обладнання чи працівників. ВТМ також може виживати або зимувати в інфікованих рослинних залишках та багаторічних (бур'янистих) господарях і, можливо, в ґрунті. Сільськогосподарські методи, такі як безперервне вирощування культур, потенційно можуть стати проблемою, особливо в теплицях, де ВТМ може накопичуватися в кількох видах рослин. [6]

1.2 Вплив вірусів на рослини

Значна втрата врожаю, спричинена вірусними інфекціями, відбувається щороку. Інфекції можуть розвиватися як на стадіях до, так і після збору врожаю. В результаті втрати врожаю призводять до значних економічних збитків. Іноді до мільярдів доларів.

Хвороби рослин виникають у результаті складної взаємодії між рослинами, патогенами та навколишнім середовищем. За довгу історію розвитку сільського господарства люди розробили різноманітні підходи до протидії захворюванням рослин. Такі системи перш за все мають на меті поліпшувати ріст та розвиток рослин-господарів. Віруси викликають різні патологічні зміни, які впливають на всі сторони життя рослин. Для більшості вірусних хвороб характерне системне ураження, при якому вірус переміщується з первинного місця інокуляції в інші частини рослинного організму. В рослині вірус зазвичай може бути присутній до тих пір, поки зараженна рослина не загине. Окрім того, вірус може передаватися нащадкам первинно інфікованої рослини шляхом вегетативного розмноження. Вірусна інфекція проявляється зовнішнім виглядом рослин. [7, 28]

В результаті дії вірусу всередині організму, фізіологія та біохімія тканин та клітин рослини змінюється. Властивості рослини-хазяїна, вірулентність і агресивність штаму вірусу, тривалість інфекції та фактори навколишнього середовища впливають на прояви хвороби, які можуть значно відрізнятися. Всі перелічені фактори визначають тривалість інкубаційного періоду, який зазвичай становить від кількох днів до тижнів, а для трав'яних рослин може тривати більше року. Вірусні інфекції вагомо змінюють метаболізм рослин, це включає зниження фотосинтетичної активності

рослин, пригнічення вуглеводного та інших видів обміну. Хлоропласти руйнуються, змінюються або агрегуються внаслідок вірусної інфекції. Це призводить до руйнування хлорофілу та пригнічення фотосинтетичної активності. Ступінь пригнічення фотосинтезу залежить головним чином від розвитку хвороби, характеристик штаму вірусу, фази розвитку хвороби, характеристик фази розвитку штаму вірусу–захворювання, рослини-господаря та умов середовища [8]

Вивчення гістологічної будови рослин *Nicotiana benthamiana* виявило гіпертрофію та гіперплазію, що призвело до утворення пухлин та енацій. Багато вірусів уражують ксилему та флоему судинної системи, що спричиняє загибель клітин. Внаслідок цього спостерігається в'янення рослин, поява некрозів на вегетативній рослині в бульбах і плодах. [9]

Явища гіпоплазії і метаплазії супроводжують карликовість рослин і зміну забарвлення при вірусному ураженні. Багато вірусів викликають зміни тонкої структури інфікованих клітин. Везикули утворюються на периферії хлоропластів під впливом тимовірусів. Хлоропласти в інфікованих вірусом тютюнової мозаїки клітинах тютюну деформуються і часто дегенерують. У цих типах клітин також пригнічується утворення нових хлоропластів. Ці зміни викликають хлороз і мозаїчне забарвлення уражених листків. [10, 29, 30]

Вірусна інфекція викликає порушення метаболізму в клітинах хворої рослини. Наприклад, при зараженні вірусами рослин порушується водний режим, що супроводжується зміною інтенсивності транспірації та надходження води внаслідок змін у судинній системі. Також відбуваються зміни в поверхні листка внаслідок розвитку некрозів (порушення роботи продихів) і відмирання частини листкового апарату. В ураженій рослині змінюється метаболізм, що може призвести до її загибелі через порушення водного балансу. Практично всі вірусні захворювання характеризуються

порушенням азотистого обміну. Віруси не мають ферментативної активності, але істотна роль ферментів рослини-хазяїна спостерігається при зміні азотовмісних сполук. Загальна кількість азоту не змінюється в тютюну зараженого мозаїчним збудником. Значна його частина все ще йде на будівництво віріону, оскільки вірусний білок утворюється за рахунок білка рослини-господаря.

Дослідження дихання уражених вірусами рослин показали, що вірусна інфекція стимулює активність дегідрози, які впливають на початкові фази дихання, і при цьому підвищується пероксидазна активність уражених рослин. Спостерігали підвищення активності дихання рослин тютюну під час інфікування ВТМ, а також виявлено підвищення окисної активності після впливу вірусної інфекції буряків і картоплі. Активацію дихання пояснюють захисними реакціями рослини-господаря. Пік активності дихання та окисні ферменти пригнічують розмноження вірусу на початку інфекції. Інтенсивність дихання зараженої рослини знижується, активується синтез віріону. Велика кількість дослідників показують, що вірусні захворювання рослин супроводжуються карликовістю; поява пухлин і утворень; зміна форми листя, квіток і плодів; утворення надлишкових бутонів та дисбаланс гормонального метаболізму в рослин під впливом вірусної інфекції. [11]

1.3 Стратегії боротьби з вірусами за допомоги трансгенних рослин

Одним із найпоширеніших методів боротьби з ВТМ є «санітарні» методи, до них можна включити видалення уражених рослин та миття рук між кожною посадкою. Існують різноманітні стратегії боротьби з вірусами

рослин, одними з таких стратегій є: методи хіміо- та термотерапії, боротьба з вірусами в польових умовах та метод генної інженерії для створення стійких до вірусу сортів.

Метод хіміотерапії заснований на додаванні в живильне середовище, де культивують рослинні експланти, противірусних препаратів широкого спектру дії. Результати експерименту показали ефективність віразолу та аміксіну щодо інгібування (78,2%). Висока противірусна активність цього препарату виявлена на різних культурах, наприклад проти вірусу кільцевої плямистості *Odonotoglossum cymbidium* і вірусів мозаїки троянди, але також виявлено його виражену токсичну дію, яка пригнічує процеси диференціації та проліферації в культурі тканин рослин *in vitro*. Виявлено речовини, які здатні інактивувати декілька вірусів. Особливого успіху в цьому напрямку було досягнуто на картоплі, тютюні, томатах, нарцисах і тюльпанах. [[12](#), [32](#)]

Метод термотерапії полягає в тому, що культивовані рослини *in vitro*, які уражені вірусом, піддаються термічній обробці при підвищених температурах. Температура може коливатися в залежності від сорту рослин та їх особливостей. Термотерапія може зменшити рух вірусу до меристематичних клітин, пригнічуючи реплікацію вірусу та посилюючи деградацію РНК. Це зменшує навантаження вірусних часток в заражених кінчиках пагонів, дозволяючи використовувати меристеми більшого розміру, ніж ті, що використовуються для культури меристем без термообробки.

Ще одним методом є метод боротьби з вірусами в польових умовах який полягає в контролі поширення вірусів рослин. Резервуарами вірусів можуть бути бур'яни по краях поля, птахи та комахи, які подорожують на великі відстані, а також віруси, які також можуть передаватися через службові агрегати. Профілактичні заходи, такі як просторова ізоляція та інсектицидні та стимулюючі обробки, є важливими для контролю поширення вірусів рослин. Ці препарати стали важливими економічними чинниками

щодо підвищення рентабельності та екологічності виробництва. Вони сприятливо впливають на ріст, розвиток, урожайність та якість рослинної продукції, але також є індукторами стійкості до абіотичних факторів стресу та різноманітних фітопатогенів, до яких належать віруси. [13]

Дослідження біобезпечних засобів боротьби з фітопатогенами є актуальними у зв'язку з підвищеною увагою до екологізації сільськогосподарського рослинництва. Важливим є пошук можливостей стимуляції імунної системи рослин і побудови системи захисту рослин, а також резервних можливостей самого організму, що відкриває нові перспективи для розвитку біотехнології.

Перспективні заходи проти вірусів рослин включають програми селекції щодо створення стійких до вірусів форм, які, зокрема, базуються на методі селекції за допомогою маркерів для оцінки генетичного захисту сорту, а також створення трансгенних сортів з високою стійкістю до вірусних захворювань. Гени, які кодують резистентність до вірусу, можуть бути введені в геном рослин за допомогою генетичної інженерії. Наприклад, гени відомі за своєю антивірусною активністю можуть бути введені в рослини, щоб забезпечити їм стійкість до конкретного вірусу. Це може бути здійснено за допомогою різних методів, таких як трансформація, агробактеріальна трансформація, або використання різних генетичних векторів. Вирощування трансгенних культур значно підвищило продуктивність світового сільськогосподарства за останні два десятиліття. Глобальний мета-аналіз впливу впровадження трансгенних культур показав, що в середньому трансгенні технології підвищили врожайність на 22%, що призвело до збільшення прибутків фермерів на 68%.

Одним із підходів є введення генів, що кодують антитіла або РНК-інтерференції, які спрямовані проти специфічних вірусів. Це дає рослинам можливість ефективно реагувати на віруси та запобігати їхньому

розмноженню. Інший підхід полягає у введенні генів, що кодують для рецепторів або ензимів, які взаємодіють з вірусами, забезпечуючи рослині врожай більшу стійкість до інфекцій. Трансгенні рослини також можуть виявляти систему резистентності. В цьому випадку, введення гена, який є аналогічним гену вірусу, дозволяє рослині впізнавати та боротися з вірусом, запускаючи сигнальні шляхи, що призводять до активації оборонних механізмів. Використання трансгенних рослин є перспективним напрямком для створення стійких та врожайних культур, які можуть витримувати вірусні напади. Це інтегроване підходу до захисту рослин може сприяти стійкості сільського господарства та забезпечити ефективний контроль над вірусними захворюваннями у рослинах. Додатковою стратегією в боротьбі з вірусами використання трансгенних рослин є розробка резистентних ліній на основі генетичної інженерії. Це означає створення рослин, які вже мають вбудовану генетичну стійкість до конкретних вірусів. Введення генів, які кодують для антитіл, інгібіторів або інших молекул, що взаємодіють з вірусами, може створити рослини зі збільшеною стійкістю до інфекцій.

Також важливим є розвиток розуміння механізмів взаємодії між рослинами та вірусами для вдосконалення трансгенетичних стратегій. Дослідження в області взаємодії рослин та вірусів, молекулярні деталі впливу вірусних білків на клітини рослин та систем резистентності допомагають оптимізувати дизайн трансгенетичних рослин. Наприклад, можливо використання техніки CRISPR/Cas для точної редагування генетичного коду рослин, щоб забезпечити їм стійкість до конкретних вірусів. Це передбачає модифікацію конкретних генів, які взаємодіють з вірусами або впливають на системи резистентності.[\[31\]](#)

Система редагування геномів CRISPR/Cas - це потужний біотехнологічний інструмент, який може бути використаний для точного редагування генетичного матеріалу рослин. Вона може бути використана для

видалення або зміни генів, які забезпечують вразливість рослин до вірусних інфекцій, а також для додавання генів, які забезпечують резистентність до вірусів. Це може бути потужним інструментом для створення генетично модифікованих рослин, які мають підвищену резистентність до вірусних інфекцій. [14, 31]

1.4 РНКазы та їхня роль в клітинах рослин

Секреторні РНКазы - це ферменти, спрямовані на секреторну систему клітини і, таким чином, локалізовані в органелах або позаклітинному просторі. У рослинах секреторні РНКазы належать до родини РНКаз Т2. Ферменти сімейства Т2 є ендорибонуклеазами, які розщеплюють РНК неспецифічно за рахунок роботи активного центру ферменту з консервативними залишками гістидину. Ферментативний механізм Т2 двоступеневий й включає трансфосфорилування та гідроліз. РНКазы Т2 консервативні майже для всіх еукаріотів, також зустрічається у великій кількості бактерій та деяких вірусів. У більшості не рослинних організмів є лише один ген такого ферменту, однак у рослин репертуар цих генів розширився, і РНКазы пристосовані для різноманітних функцій. Принаймні чотири гени знаходяться в кожному геномі покритонасінної рослини. [15, 16, 33]

Філогенетичний аналіз дозволив розділити РНКазы Т2 на три класи, а саме:

І клас - білки, які пов'язані з різноманітними реакціями на стрес.;

II клас – консервативні для насінневих рослин ферменти, і їх функція пов'язана з реутилізацією РНК;

III клас - головним чином пов'язаний із самонесумісністю, хоча інші функції також відомі для цього класу. Історично ферменти III класу було названо S-РНКазами, тоді як інші рослинні ферменти родини T2 є S-подібними РНКазами. Багато РНКаз I класу також пов'язані з відповіддю на абіотичний та біотичний стрес. У деяких випадках можна передбачити субстрат, безпосередньо пов'язаний з біологічною функцією, наприклад, мова йде про захист проти РНК-вірусів або під час фосфатного голодування. Важливо, що в роботі використана *ZRNase II* (рибонуклеаза цинії), яка належить саме до I класу T2 рибонуклеаз. [15, 16, 17,18]

S-подібні РНКазы, індуються при старінні рослини, оскільки цей процес характеризується деградацією макромолекул (у тому числі РНК) і зниженням фотосинтетичної активності. Поранення також є індуктором позаклітинних РНКаз, котрі розщеплюють РНК для повторного використання фосфатів навколишніми клітинами. Компоненти апопласту відіграють головну роль на перших етапах взаємодії рослин з патогенами. Позаклітинні РНКазы можуть потенційно брати участь у протидії вірусам, оскільки їх локалізація позаклітинна, вони мають низький рівень активності в інтактних листках та індуються у відповідь на поранення та атаку збудника. [18]

На даний час точний механізм антивірусного захисту рослин за допомогою рослин ще не відомий. Виділяють три можливих механізми впливу РНКазы на РНК вірусів, які можуть проявлятися на будь-якій стадії клітинної інфекції.

На першому етапі, коли РНКазы взаємодіє з вірусом поза клітиною, вона може сприяти руйнуванню вірусної РНК. Хоча точний механізм проникнення РНКазы всередину віріону залишається невідомим, ефективність вірусу зменшується при прямому впливі РНКазы на вірусні частки. На наступному етапі РНКазы може взаємодіяти з вірусом всередині ендосоми, що особливо

актуально для екзогенних РНК. Зокрема, внутрішньоядерна локалізація РНКаз була підтверджена тільки для бичачої РНКаз. Важливим також є вивчення можливості екзогенних РНКаз впливати на процес РНК-інтерференції, що є складовою системи захисту від вірусів. Таким чином, противірусна активність РНКаз включає як прямий вплив на нуклеокапсид та нуклеїнову кислоту, так і непрямий вплив через регулювання РНК-інтерференції та індукцію апоптозу в заражених клітинах. [18]

Рибонуклеази T2 відіграють важливу роль у рослинах. Вони знаходяться в рослинних тканинах та можуть брати участь у багатьох фізіологічних процесах, таких як розвиток рослин, відповідь на стресові фактори, а також захист від патогенних мікроорганізмів.

Один з найвідоміших представників рибонуклеаз T2 у рослинах - це RNS2, який знаходиться в насінні та рослинних тканинах. RNS2 відіграє важливу роль у розвитку насіння та його гермінації. Він забезпечує розщеплення РНК молекул в ендоспермі, що дозволяє звільнити енергію для росту проростків.

Крім того, рибонуклеази T2 можуть бути використані для захисту рослин від патогенних мікроорганізмів, таких як гриби та бактерії. Наприклад, рибонуклеаза ХПРО1 знаходиться в кукурудзі та може бути активована під час інфекції грибами *Fusarium*. Вона здатна розщеплювати РНК грибів, що дозволяє рослині знизити рівень інфекції та забезпечити захист від небезпеки.

Рибонуклеази T2 є важливими компонентами фізіології рослин. Вони беруть участь у розвитку насіння, гермінації та відповіді на стресові фактори, а також можуть використовуватися для захисту рослин від патогенних мікроорганізмів. [19]

1.5 *Nicotiana benthamiana* як модельна система

Nicotiana benthamiana має короткий життєвий цикл, що робить її широко використовуваною модельною системою для досліджень на ядерному, органелярному, клітинному, органному чи цілісному рослинному рівнях. Ця рослина є найпопулярнішим експериментальним хазяїном для оцінки розвитку вірусного ураження, головним чином через свою сприйнятливість до різноманітних вірусів та здатність проявляти чітко виражену системну реакцію, що дозволяє візуально оцінити ступінь розвитку інфекції та порівняти її розвиток у контрольних і трансформованих рослинах. *N. benthamiana* швидко набирає популярності в біології рослин, оскільки вона може легко бути генетично трансформована та регенерована з хорошою ефективністю та здатна високо ефективно продукувати цільові білки інтересу, зокрема і ті, що відповідають за розвиток вірусостійкості. [[34](#), [35](#), [36](#)]

1.6 Вірусні системи експресії та використання GFP

Глобулярний зелений флуоресцентний білок (GFP) є популярним інструментом у біологічних дослідженнях, особливо у вірусології. GFP є флуоресцентним білком, який видає зелене світло під впливом світла певної довжини хвилі. Конструкція GFP включає в себе ген, який кодує білок GFP, а також регуляторні елементи, такі як промотор для управління експресією. [[20](#),[21](#)]

Вірусні системні експресії з використанням GFP дозволяють відстежувати динаміку вірусних білків та процесів реплікації в реальному часі. Для цього до геному вірусу додають конструкцію GFP. Коли вірус виражається в клітинах господаря, білок GFP також виражається, що дозволяє дослідникам відстежувати локалізацію та кінетику розповсюдження вірусу. [[20,21](#)]

Один із підходів до використання GFP в науці - це створення рекомбінантних вірусів з вбудованим геном GFP. Наприклад, у вірусології можна використовувати GFP для візуалізації вірусних часток, вивчення механізмів введення вірусу до клітини, вивчення впливу антивірусних засобів на процеси реплікації та багато іншого. [[20](#), [21](#), [22](#), [36](#)]

1.7 Вірусні вектори

Вірусні вектори є потужними інструментами в біотехнології та молекулярній біології, дозволяючи ефективно введення генетичного матеріалу в клітини рослин. Дослідження значно сприяли розумінню та розвитку цієї технології. Роботи дослідників зосереджувалися на створенні вірусних векторів, які можуть використовуватися для генетичної модифікації рослин. Роботи демонструють, як вірусні вектори можуть ефективно переносити гени і забезпечувати їх стабільну експресію в рослинах. [[44,45](#)]

Одним з ключових досягнень стало розроблення векторів на основі вірусу тютюнової мозаїки (VTM). Ці вектори можуть переносити значні фрагменти ДНК, що робить їх надзвичайно корисними для генетичної

інженерії рослин. Використання ВТМ-векторів дозволило значно підвищити рівень експресії чужорідних генів у рослинах, що є важливим для промислового виробництва біологічно активних речовин.[\[46\]](#)

Інше важливе досягнення стосується розробки векторів на основі вірусу мозаїки люцерни (АМВ). Ці вектори відрізняються високою ефективністю трансформації і стабільністю експресії введених генів. Використання АМВ-векторів відкриває нові можливості для генетичної модифікації широкого спектру рослин. Також вектор може розширити коло господарів для вірусу ВТМ, наприклад для шпинату.[\[46\]](#)

Дослідження також охоплюють створення мультигенних векторів, що дозволяють одночасно вводити кілька генів у рослину. Це значно підвищує ефективність генетичних маніпуляцій і відкриває нові можливості для створення рослин з комплексними ознаками, такими як стійкість до хвороб, поліпшені харчові властивості та підвищена продуктивність.

Таким чином, вірусні вектори можуть зробити значний внесок у розвиток біотехнології. Вони можуть сприяти прогресу в області сільськогосподарської біотехнології та відкрити нові можливості для створення генетично модифікованих рослин з бажаними властивостями.[\[44,45\]](#)

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Рослинний матеріал

Рослини *Nicotiana benthamiana* були трансформовані векторною конструкцією pBI-RNS, що містить цільовий ген РНКазини цинії *ZRNase II*. У нашій роботі для генетичної трансформації були використані лінії тютюну RNS1-RNS4, що підтримуються у колекції Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Трансгенні рослини були отримані у лабораторії генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії шляхом агробактеріальної трансформації [40]. Для дослідження впливу системної вірусної інфекції трансформованої рослини використовували векторні конструкції pICH27556 (містить у своєму складі CP вірусу PVX, ген PVX-полімерази та гени, що кодують вірусні білки 25K, 12K, 8K та репортерний ген *gfp*) у *Agrobacterium tumefaciens* штам GV3101 та додаткову векторну конструкцію pICH 6692 з геном супресором сайленсингу (p19). Рослини були акліматизовані до тепличних умов та проведена інфільтрація відповідними конструкціями. Поширення вірусної інфекції визначали за флуоресценцією GFP.

2.2 Використані реактиви

MS/2, стерильні контейнери, горщики P9, торф'яний субстрат TS1, “Білизна” фірми Sama, дистильована вода, охолоджений буфер, NaCl, N-етилмалеїмід, HClO₄, PBS, карбонат-бікарбонатний буфер, буфер для

нанесення антитіл, буфер відмивки, субстратний буфер, буфер для лужної фосфатази, середовище LB

2.3 Культивування рослинного матеріалу *in vitro*

1. Для цього стерильно ділили рослину на міжвузля та переносили на середовищі MS або $\frac{1}{2}$ MS.
2. Субкультивування проводили кожні три тижні

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

Речовини	Вміст сполук у середовищах, г	
	MS	$\frac{1}{2}$ MS
NH_4NO_3	33,000	16,500
KNO_3	38,000	19,000
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	7,400	3,700
KH_2PO_4	3,400	1,700
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	8,800	4,400
H_3BO_3	0,310	0,310
$\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,1205	0,1205
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,530	0,530
KI	0,415	0,415

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,125	0,125
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025
$\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	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
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	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

2.4 Акліматизація рослин до тепличних умов

1. Рослини тютюну пройшли двоступеневу адаптацію. Спочатку їх висаджували на агаризоване середовище MS у стерильні герметичні контейнери і вирощували до висоти 7-8 см.
2. Після цього пересаджували рослини в горщики P9 (розміром 9 на 9 см) з торф'яним субстратом TS1 і покривали ковпаком для підтримання вологості повітря.
3. Через два тижні після пересадки кришки з горщиків знімали.

4. Усі адаптовані рослини далі вирощували в тепличних умовах з контрольованою температурою $+24^{\circ}\text{C}$, 16-годинним світловим режимом і освітленістю на рівні 2000 люкс.

2.5 Стерилізація рослинного матеріалу

1. Насіння рослини *Nicotiana benthamiana* було поміщено в розчин “Білизни” на 10 хвилин в мікропробірки.
2. Потім насіння промивали дистильованою водою. Процедура була проведена по 10 хвилин в три повторності.
3. Після проведення стерилізації насіння було висаджено на стерильні чашки Петрі з агаризованим середовищем MS [37]. Рослини вирощувалися у тепличних умовах за температури $+24^{\circ}\text{C}$. Фотоперіод становив 16 год світла/ 8 год темряви.

2.6 Вимірювання рибонуклеазної активності

Для вимірювання рибонуклеазної активності ми використовували рослини, які були вирощені *in vitro*. Вони мали розмір до 10 см, а вік їх становив 3-4 тижні після пасажу. Відбір таких рослин був обумовлений

необхідністю забезпечення стандартизації дослідження та однакових умов для всіх дослідних рослин.

Кількість рослин в кожній дослідній групі було по 10 рослин. Це дозволило нам забезпечити надійність результатів та зробити порівняння між різними групами рослин на належному рівні. Такий підхід до добору рослин допоміг уникнути впливу варіативності у віці та розмірі на результати дослідження.

1. Дослідження загальної РНКазної активності проводили за допомогою колориметричного методу в присутності орцину, який був описаний у дослідженні [38].
2. Листя рослин (400 мг) гомогенізували у охолоджену буфері 0,05 М трис HCl (pH 7,5) з додаванням 0,15 М NaCl та 1 мМ N-етилмалеїміду. Обсяг інкубаційної суміші становив 3 мл.
3. Гомогенат центрифугували протягом 20 хвилин при 6000 обертів на хвилину на центрифугузі.
4. Для визначення РНКазної активності використовували аліквоти отриманих екстрактів. Для цього 0,5 мл екстракту інкубували в повторах протягом 6 та 66 хвилин за температури +31°C.
5. До повторів додавали 1 мл 34% H₂SO₄ та центрифугували ще протягом 20 хвилин при 6000 обертів на хвилину. Потім до розчину додавали 1 мл орцинового реактиву.
6. Після охолодження розчину вимірювали оптичну щільність при довжині хвилі 670 нм за допомогою спектрофотометра.

2.7 Візуальна діагностика рослин

1. Рослини тютюну були інокульовані вірусом тютюнової мозаїки в концентрації 21 мг/мл
2. Кожні 3-4 дні проводилася візуальна перевірка наявності вірусних симптомів

2.8 Проведення непрямого ІФА

PBS (pH 7,4; 0,1 M):

NaCl – 8,0 г;

KCl – 0,2 г;

Na₂HPO₄ – 1,44 г;

KH₂PO₄ – 0,24 г;

H₂O – довести до 1 л.

Карбонат-бікарбонатний буфер (pH 9,6; 0,05 M):

Na₂CO₃ – 1,59 г;

NaHCO₃ – 2,93 г.

Буфер для нанесення антитіл:

0,1 M PBS;

1% молоко;

0,05% Tween 20.

Буфер відмивки:

0,1 M PBS;

0,2% Tween 20.

Субстратний буфер:

1 мг субстрату (4-нітрофенілфостфатна динатрієва сіль);

10 мг буферу для лужної фосфатази.

Буфер для лужної фосфатази: 97 мл довести до 1 л H₂O.

1. Гомогенізували рослинний матеріал в PBS у співвідношенні 1:2.
2. Отриману суміш перенесли у епандорфи, розмістили їх у центрифужні пробірки, збалансували та центрифугували протягом 20 хвилин при 4000 обертів за хвилину при температурі +4°C.
3. Після центрифугування збирали супернатант у чисті епандорфи, додаючи по 50 мікролітрів зразка у лунку полістеролового 96-лункового планшету, за винятком лунки K1, яка містить антиген.
4. До 50 мікролітрів рослинного матеріалу з вірусним антигеном додають 50 мікролітрів карбонат-бікарбонатного буферу. Планшет інкубують протягом ночі при температурі +4°C.
5. Наступного дня планшет відмивають тричі буфером відмивки протягом трьох хвилин.
6. В кожну лунку додають по 100 мікролітрів первинних антитіл у кінцевому розведенні 1:25000, за винятком лунки K2 без первинних антитіл. Первинні антитіла поліклональні кролячі, отримані у віварії ННЦ Інститут біології та медицини у 2020 році.
7. Наступного дня планшет знову відмивають тричі буфером відмивки протягом трьох хвилин.
8. Далі додають вторинні антитіла у кінцевому розведенні 1:30000 у кожну лунку, за винятком лунок K3 (контроль без других антитіл). Інкубація проводиться протягом 2 годин при температурі +37°C.
9. Планшет знову відмивають тричі по три хвилини буфером відмивки і один раз протягом трьох хвилин PBS.
10. У лунку A1 додають буфер для нанесення антитіл, в усі інші - субстратний буфер.
11. Інкубацію проводили протягом години при кімнатній температурі.

12. Окремо на предметному скельці проводять контроль других антитіл і субстратного буфера: змішують краплини розчину вторинних антитіл і субстратного буфера. Пожовтіння краплі свідчить про валідність методу.
13. Оптична густина вимірюється за довжиною хвилі 405 нм.

2.9 Культивуація бактерії

1. Бактерії *A. tumefaciens* вирощували на середовищі LB, яке було описане у дослідженні [39].
2. Отриману бактеріальну культуру вирощували протягом 48 годин при температурі +27°C з постійним перемішуванням на шейкері.
3. Після нарощування, бактеріальні клітини осаджували на центрифугу при 300 обертів на хвилину протягом 10 хвилин, після чого осад ресуспендували у розчині 10 мілімоль на літр 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
----	---------

2.10 Агробактеріальна інфільтрація

1. Для дослідження можливих особливостей розвитку системної вірусної реакції, як модельна система вірус-рослина, були використані трансгенні рослини *Nicotiana benthamiana* з внесеним геном *ZRNAse II*.
2. Для цього, контрольні та трансгенні рослини були інфільтровані агробактеріальною суспензією, що містила векторну конструкцію pICH27566.
3. Для пригнічення процесів мовчання був використаний додатковий генетичний вектор pICH 6692, який містив супресор сайлентсну вірусного походження. Схеми цих векторів представлені на рисунках 1 та 2.

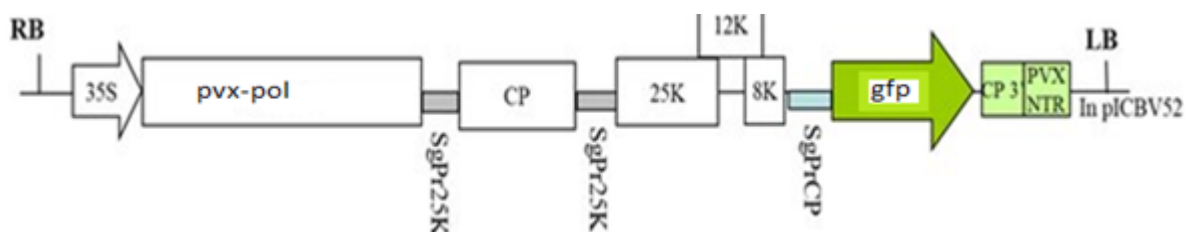


Рис 2.3 Схема вектора pICH 27566 35S-35S промотор CaMV; *pvx-pol* – ген PVX РНК полімерази; SgPr25K – субгеномний промотор PVX білку 25K; *cp* – ген білку оболонки PVX; 25k, 12k, 8k – гени які кодують білки PVX 25K, 12K, 8K; SgPrCP – субгеномний промотор білку оболонки PVX; *gfp* – ген GFP; CP 3'-3' кінець білку оболонки PVX; PVX NTR-3'UTR PVX

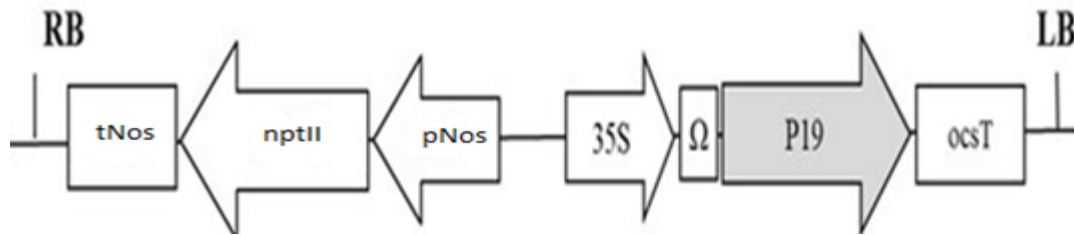


Рис 2.4 Схема допоміжного вектора pICH 6692 35S-35S промотор CaMV; Ω -5' омега нетрасуючий регіон; p19 – ген білку P19 (супресор сайленсингу); ocsT – термінатор октапін синтетази; pNos, tNos – промотор і термінатор нопалін синтази; npt II – ген *nptII*

2.11 Інфікування рослинного матеріалу вірусом тютюнової мозаїки

1. Рослини інокулювали нативним вірусом ВТМ, який був отриманий на кафедрі вірусології ННЦ “Інституту біології та медицини” КНУ ім. Шевченка. Вірусовмісний матеріал для інфікування виділяли з рослин з симптомами вірусних інфекції.
2. Інокулювання рослин проводилось шляхом механічної скарифікації вірусовмісного препарату в молоде листя дослідних та контрольних рослин.

2.12 Розщеплення в поколіннях

1. З вирощених дослідних та контрольних рослин *Nicotiana benthamiana* було отримано насіння.

2. Отримане насіння висаджували на агаризоване середовище з додаванням канаміцину.
3. Пророщені рослини, аналізували та порахували розщеплення.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Культивування рослинного матеріалу та акліматизація

Клоновані рослини різних ліній розмножувалися в умовах *in vitro* на агаризованому середовищі, ми здійснювали пасажування рослин кожні три тижні. Коли рослини досягали висоти приблизно 2 см, їх пересаджували на агаризоване середовище MS в стерильні герметичні контейнери. Тут вони продовжували розвиватися до висоти близько 7-8 см. Після цього пересаджували рослини в горщики P9 (розміром 9 на 9 см) з торф'яним субстратом TS1 та накривали ковпаком для збереження вологості повітря. Через два тижні кришку знімали.

Усі адаптовані рослини потім продовжували ріст у тепличних умовах з контрольованою температурою +24°C, 16-годинним світловим режимом і освітленістю на рівні 2000 люкс. Така оптимальна температура та світловий режим сприяли ефективній акліматизації рослин. Після двотижневого періоду адаптації ковпак з горщиків знімали, що дозволило рослинам далі вільно розвиватися.

Цей метод акліматизації рослин дозволив досягти ефективності приживлюваності на рівні 80%, що свідчить про успішну пристосованість рослин до нових умов вирощування.

3.2 Загальна рибонуклеазна активність

Після визначення трансгенної природи досліджуваних рослин, ми вирішили оцінити рівень рибонуклеазної активності у зразках. Для цього ми застосували орциновий метод та вимірювали результати спектрофотометрією. Отримані дані представлені на рис. 3.1.

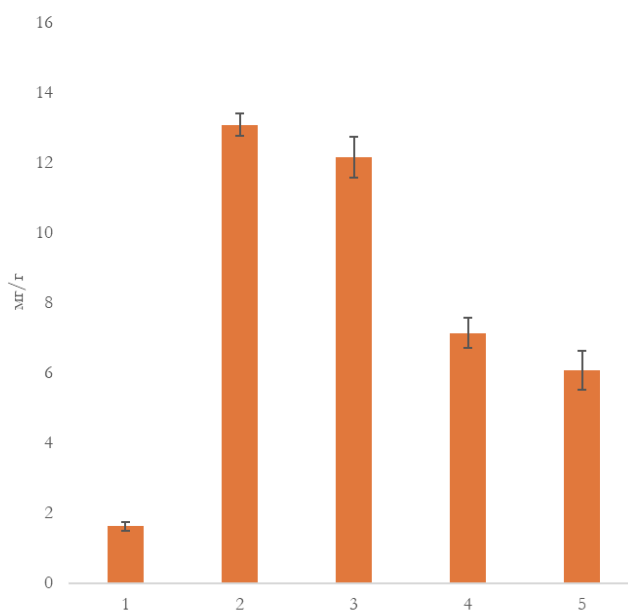


Рис 3.1: Загальна активність РНКаз в екстрактах листа *N. benthamiana*, мг/г
1 – контрольні рослини дикого типу; 2-5 – лінії з геном *ZRNase II*

З графіку видно, що рівень рибонуклеазної активності у трансгенних рослин з геном позаклітинної рибонуклеази *Zinnia elegans* значно перевищує рівень активності у контрольних рослинах. Це свідчить про інтеграцію та успішну експресію зазначеного гену в геномі трансгенних рослин. Порівнюючи з контролем, можемо визначити, що трансгенні лінії 1 та 2 мають значно вищі показники рибонуклеазної активності у 10-12 разів вищі, а лінії 3 та 4 також виявляють підвищену активність, але вже в 4-6 разів. Це

говорить про ефективну експресію гена *ZRNase II*, що був інтегрований в трансгенні рослини.

Рослини тютюну, що пройшли модифікацію за допомогою вектора з геном рибонуклеази *Zinnia elegans* у дослідях групи Трифонової та співробітників [41], продемонстрували значний ріст рибонуклеазної активності на рівні від 3,5 до 14,4 разів у порівнянні з контрольними рослинами. В іншому дослідженні, проведеному цими ж вченими [42], трансгенні рослини тютюну, які були модифіковані з тим самим геном, показали збільшення активності рибонуклеази вище на 1,6-3 рази порівняно з контролем.

Порівнюючи наші результати з висновками інших наукових досліджень, ми можемо визначити, що ген рибонуклеази *Zinnia elegans* ефективно експресується в тютюні. Наші дослідження свідчать про значний приріст рибонуклеазної активності між контрольними та трансгенними рослинами, що підтверджує успішність внесення генетичних змін у рослини тютюну з метою підвищення рівня рибонуклеазної активності.

Додатково, важливо зазначити, що в подальшому етапі досліджень було виявлено, що рослини з трансгенних ліній 1 та 2 не продемонстрували здатності до розмноження. Це може бути пов'язано з високою активністю рибонуклеаз у цих лініях, що може вплинути на процеси репродукції та розвитку наступних поколінь. Наші припущення полягають у тому, що *N. benthamiana* з такими показниками рибонуклеазної активності може виявити обмежену здатність до формування наступного покоління. Однак ці результати вимагають подальших досліджень для визначення точної причини цього явища. Варто

також відзначити, що рослини з трансгенних ліній з меншими показниками рибонуклеазної активності успішно дали потомство.

3.3 Дослідження системного вірусного транспорту в рослинах *N. benthamiana* трансформованих геном *ZRNase II*

В модельній системі вірус-рослина використовувалися трансгенні рослини *N. benthamiana*, що мали в собі ген *ZRNase II*. Ці рослини були піддані інфільтрації агробактеріальною конструкцією, що включала в себе компоненти вірусу картоплі X і репортерний ген *gfp*. Продукт цього гена має здатність світити в ультрафіолетовому спектрі, що дозволяло візуально спостерігати за поширенням вірусу у реальному часі. Інфільтрацію виконували за допомогою суспензії, яка містила основну векторну конструкцію, а також додатковий генетичний вектор, що був необхідний для пригнічення можливого мовчання генів. Візуалізація отриманих результатів представлена на рисунку 3.2.

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

Системне поширення вірусних частинок в рослинах дикого типу стало видимим на другому тижні після їх інфікування. Розповсюдження вірусу відслідковувалося за допомогою свічення GFP. Частки вірусу спостерігалися навіть у наступному листку після інокуляції. Далі світіння GFP було помічено у молодих листках. Також спостерігалося свічення GFP в судинних пучках, особливо у центральних та бічних жилках пагонів.

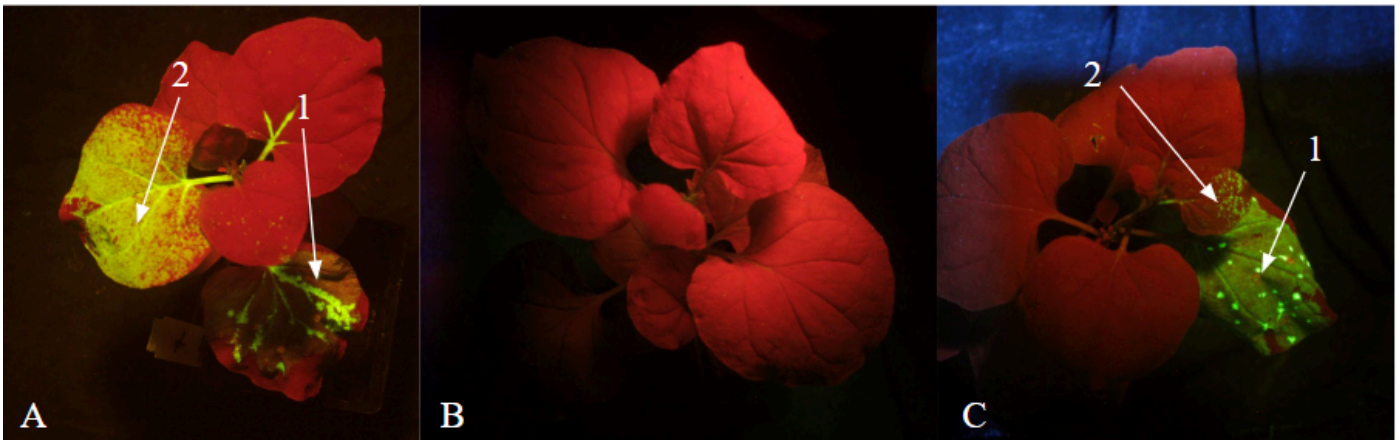


Рис 3.2 Флуоресценція GFP в рослинах *N. benthamiana* через 3 тижні після агроінфільтрації векторними конструкціями pICH 27566 та pICH 6692

Рослини дикого типу А – інфікований контроль, В – неінфікований контроль; С - інфікована рослина з геном *ZRNase II*.

1 – зона первинної інфільтрації; 2 – системна вірусна інфекція

В результаті дослідження було встановлено, що в трансгенних лініях рослин спостерігалось змінене проявлення системної вірусної реакції. Незважаючи на високу активність РНКаз в лініях №1 та №2, процес вірусної інфекції протікав помірно повільніше. У трансгенній лінії №1 системну реакцію спостерігали з затримкою на 5-6 днів порівняно з контрольною групою. У цих рослинах GFP виявляли в листках другого та третього рівнів відносно місця інфільтрації. У трансгенній лінії №2 флуоресценція GFP була помічена в молодому листі першого рівня на 7-9 день після початку інфекції порівняно з контролем, а в листках другого та третього рівня - через 14-15 днів. У лініях №3 та №4 розвиток системної реакції сповільнився найбільш. Лінія №3 виявилася найстійкішою, де чітко виражену системну реакцію спостерігали лише через місяць після інфекції в рослинах дикого типу. Ці результати свідчать про те, що у трансгенних рослинах вірусна інфекція

прогресувала повільніше, а цей процес залежав від конкретної лінії рослин.

Ймовірно, причиною повільного прогресу інфекції у рослинних лініях №1 та №2 при високій активності загальної РНКазиди може бути сигнал про складні молекулярно-біологічні процеси, пов'язані із взаємодією перенесеного гена з рослинним геном.

3.4 Розщеплення в поколіннях

З трансгенних і контрольних рослин було отримано насіння, яке було пророщували в поживному середовищі $\frac{1}{2}$ MS з додаванням канаміцину. На рисунку 3.3 зображено контроль та дві трансгенні лінії, а саме 3 та 4, де спостерігається наявність вродженої стійкості до канаміцину. У цей спосіб ми проводили дослідження розщеплення в поколінні та вивчали ступінь передачі генетичних властивостей нащадкам.

Лінії 1 та 2 не формували насіння, і ми робимо припущення, що через те що у зазначених лініях спостерігається висока рибонуклеазна активність, що це може бути потенційною причиною цього явища. Це спостереження вказує на можливий зв'язок між кореляцією підвищеної рибонуклеазної активності та фенотиповими змінами, такими як відсутність насіння.

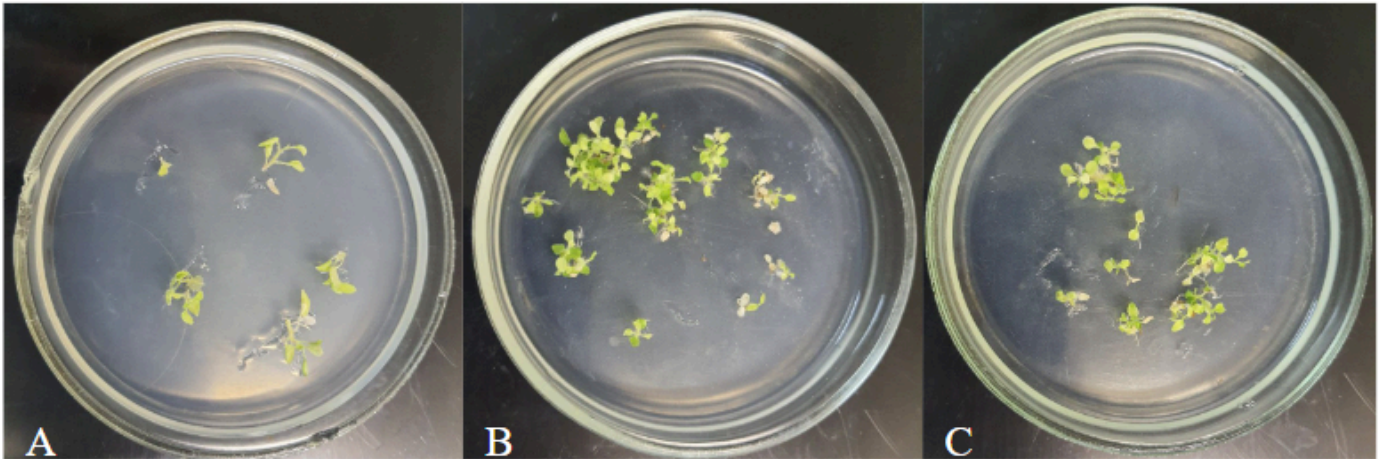


Рис. 3.3 Культивування рослин *N. benthamiana*, T1 in vitro на середовищі з канаміцином для вивчення успадкування трансгенів

A - контроль; B - трансгенна лінія №3; C - трансгенна лінія №4.

У кожній лінії було підраховано кількість пророслих рослин і відокремлено хлорофіл дефектні рослини, які втратили зелений колір, що вказує на відсутність експресії гена або відсутність самого гена. За другим законом Менделя, що при схрещуванні гібридів першого покоління у нащадків спостерігається розщеплення у співвідношенні 3:1. За нашими результатами трансгенні лінії №3 (25:9) та №4 (20:5) мають розщеплення 3:1. Це свідчить, що в цих лініях було інтегровано копії гена.

3.5 Візуальна діагностика

Після введення вірусу в рослини, ми ретельно спостерігали за проявом вірусної реакції в трансгенних і контрольних рослинах. Результати наших спостережень показали, що контрольні рослини виявили симптоми за 2,5-3 тижні після інокуляції вірусом ВТМ. У той час, як у трансгенних рослин з появою симптомів ВТМ спостерігали через 4-4,5 тижнів після інокуляції.

Одним із ключових спостережень було те, що трансгенні рослини виявили вищу стійкість до вірусу ВТМ порівняно з контрольними. Це виявлено за відкладеним початком прояву симптомів у трансгенних рослинах, що свідчить про ефективність внесених змін у їхньому геномі. Таке сповільнення розвитку симптомів у трансгенних рослин може мати важливе значення для подальших досліджень в галузі біотехнологій і захисту рослин від вірусних захворювань.

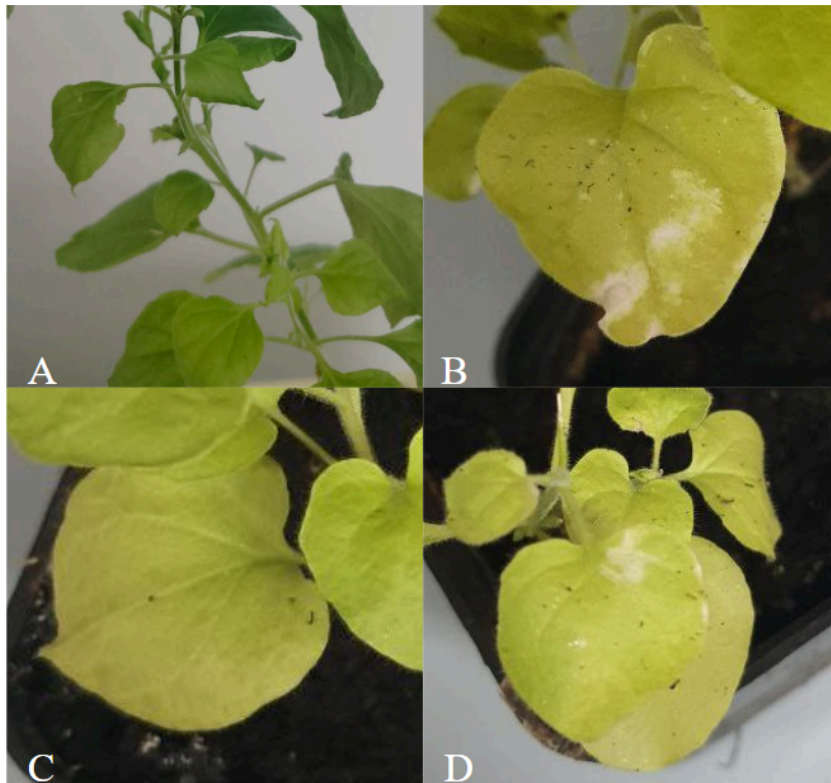


Рис. 3.4 Візуальні симптоми вірусної інфекції у рослин *N. benthamiana*

А - неінфікований контроль; В - інфікований контроль (виявили симптоми за 2,5-3 тижні після інокуляції вірусом ВТМ); С - трансгенна лінія №3 (поява симптомів ВТМ спостерігали через 4-4,5 тижнів після інокуляції); D - трансгенна лінія №4 (поява симптомів ВТМ спостерігали через 4-4,5 тижнів після інокуляції)

Стосовно різниці в перебігу вірусної інфекції між трансгенними і контрольними рослинами тютюну, важливо зазначити, що симптоми були

менш яскравими та менше вираженими у трансгенних рослин. На відміну від контрольних рослин, де спостерігалися типові для ВТМ-інфекції симптоми, такі як деформація листової пластинки та хлороз, трансгенні рослини мали менше виражені ознаки зараження.

У трансгенних рослин спостерігали помірне зниження інтенсивності симптомів, а також сповільнення поширення інфекції по стеблу і листках інфікованих рослин. Незважаючи на те, що симптоми були менш вираженими, трансгенні рослини все ще проявляли ознаки вірусної інфекції.

Ця різниця в симптоматиці та характері інфекції між трансгенними і контрольними рослинами свідчить про ефективність генетичної трансформації. Такий підхід може мати значний потенціал для покращення стійкості рослин до вірусів і підвищення врожайності у важливих для сільськогосподарського виробництва культур.

3.6 Проведення непрямого ІФА

ІФА є важливим методом для діагностики вірусних інфекцій у фітопатології. У нашому дослідженні ми використовували непрямий ІФА, що дозволило отримати результати щодо концентрації вірусних антигенів. Результати, представлені на рисунку 3.5, показали, що концентрація вірусного антигену у лініях №2 та №3 мають значно нижчі концентрації

вірусного антигену, а в трансгенній лінії №4 не було відмічено зменшення вірусу у порівнянні з контролем.

Результати ІФА свідчать про те, що експресія гетерологічних рибонуклеаз у трансгенних лініях *Nicotiana benthamiana* №2 та №3 призводить до зменшення вірусного навантаження у порівнянні з інфікованим контролем. Це може свідчити про те, що гетерологічні рибонуклеази мають антивірусну активність і можуть бути використані для підвищення стійкості рослин до вірусних інфекцій.

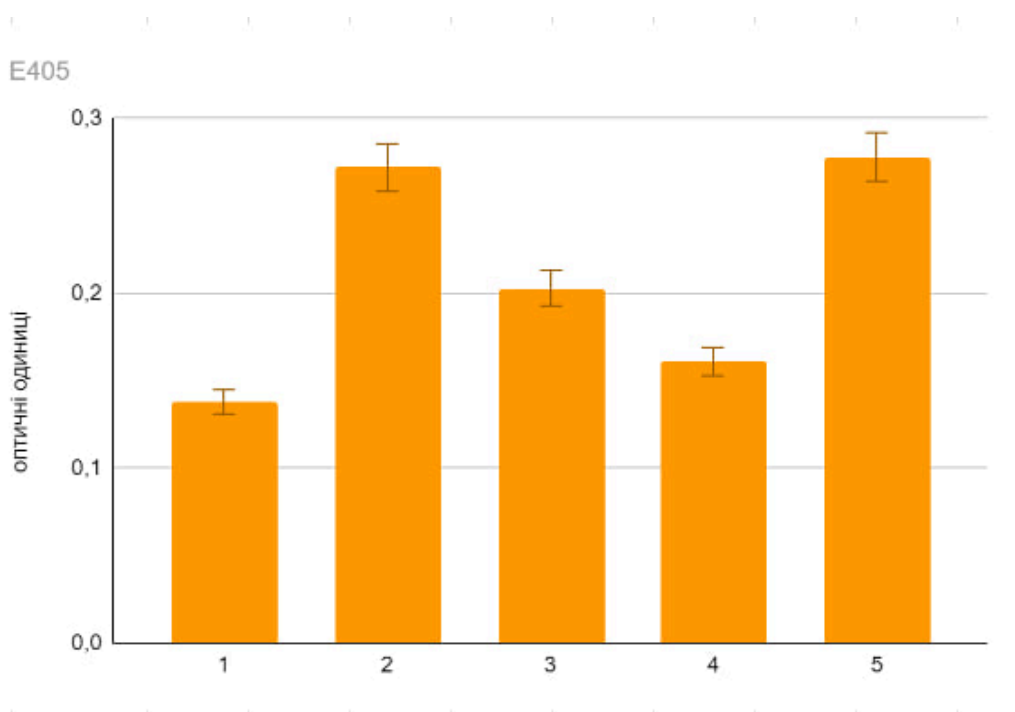


Рис 3.5 Результат ІФА в непрямій модифікації; 1- неінфікований контроль; 2-інфікований контроль; 3- трансгенна лінія №2; 4- трансгенна лінія №3; 5- трансгенна лінія №4.

Додатково, ми розглянемо можливі фактори, які можуть впливати на ефективність конструкції та взаємодію з вірусом. Це може включати аналіз

різних методів інокуляції, різні часові точки інокуляції, а також додаткові контрольні експерименти з іншими типами вірусів або різними умовами культивування рослин. Наша мета - не лише підтвердити гіпотезу, а й зрозуміти більше про механізми взаємодії між конструкцією та вірусом для подальшого вдосконалення методів боротьби з вірусними інфекціями у рослинному виробництві.

У нашій роботі було досліджено особливості розвитку системних вірусних реакцій в рослинах *Nicotiana benthamiana*, які експресують гетерологічну РНКазу. Основною метою дослідження було з'ясування впливу гетерологічної РНКазу на розвиток вірусних інфекцій у рослинах.

Для досягнення цієї мети було проведено низку експериментів, а саме: інфікування трансгенних та контрольних рослин *Nicotiana benthamiana*, вимірювання загальної рибонуклеазної активності та проведення ІФА в непрямій модифікації.

Результати нашої роботи показали, що експресія гетерологічної РНКазу в рослинах *Nicotiana benthamiana* призводить до значного зниження вірусного навантаження та пригнічення розвитку вірусної інфекції. Це свідчить про те, що гетерологічна РНКазу може бути ефективним засобом для захисту рослин від вірусних інфекцій.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що експресія гетерологічної РНКазиди значно впливає на розвиток вірусних інфекцій у трансгенних рослинах.
2. Виявлено ефективність експресії гетерологічної РНКазиди для підвищення стійкості рослин до вірусних інфекцій. Зокрема, трансгенні рослини показали вищий рівень стійкості до вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) порівняно з контрольними рослинами.
3. Експресія гетерологічної РНКазиди сприяє зниженню рівня вірусного навантаження у трансгенних рослинах, це підтверджує можливість використання РНКазиди, як ефективного засобу для захисту рослин від вірусних захворювань.
4. Практичне значення отриманих результатів полягає у можливості застосування гетерологічних рибонуклеаз для створення вірусостійких сортів сільськогосподарських культур, що сприятиме підвищенню продуктивності та якості врожаю.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Abdelkhalek A and Sanan-Mishra N. 2018. A comparative analysis of the suppressor activity of tobacco mosaic virus proteins in the tomato plant. *Jordan J Biol Sci.*, 11(4): 469 – 473.
2. Hong Y, Zheng Q, Cheng L, Liu P, Xu G, Zhang H, Cao P, Zhou H. Identification and characterization of BTM-induced volatile signals in *Nicotiana benthamiana*: evidence for JA/ET defense pathway priming in congeneric neighbors via airborne (E)-2-octenal. *Funct Integr Genomics.* 2023 Aug 12;23(3):272. doi: 10.1007/s10142-023-01203-z. PMID: 37568053; PMCID: PMC10421810.
3. Klug, A. (1999). The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences*, 354(1383), pp. 531–535
4. Zaitlin, M. (2011) Tobamovirus. In: C. Tidona, G.Darai, eds. 2011. *TheSpringer Index of Viruses*. Springer, New York, NY. Hull, R. (2009). *Comparative plant virology*. 2nd ed. New York: Elsevier Academic Press.
5. Adams, M., Adkins, S., Bragard, C., Gilmer, D., Li, D., MacFarlane S., Wong, S-M., Melcher, U., Ratti, C. and Ryu K. H. (2017). ICTV virus taxonomy profile: Virgaviridae. *Journal of General Virology*, 98(8): pp. 1999–2000.
6. Karen-Beth, G. Scholthof. 2005. Tobacco mosaic virus. The Plant Health Instructor. Texas A&M University.
7. Ershova N, Sheshukova E, Kamarova K, Arifulin E, Tashlitsky V, Serebryakova M, Komarova T. *Nicotiana benthamiana* Kunitz peptidase inhibitor-like protein involved in chloroplast-to-nucleus regulatory pathway

- in plant-virus interaction. *Front Plant Sci.* 2022 Nov 10;13:1041867. doi: 10.3389/fpls.2022.1041867. PMID: 36438111; PMCID: PMC9685412.
8. Chen S, Li W, Huang X, Chen B, Zhang T, Zhou G. Symptoms and yield loss caused by rice stripe mosaic virus. *Virology*. 2019 Nov 27;16(1):145. doi: 10.1186/s12985-019-1240-7. PMID: 31771593; PMCID: PMC6880357.
 9. Gupta N, Reddy K, Bhattacharyya D, Chakraborty S. Plant responses to geminivirus infection: guardians of the plant immunity. *Virology*. 2021 Jul 9;18(1):143. doi: 10.1186/s12985-021-01612-1. PMID: 34243802; PMCID: PMC8268416.
 10. Bhattacharyya D, Gnanasekaran P, Kumar RK, Kushwaha NK, Sharma VK, Yusuf MA, Chakraborty S. A geminivirus betasatellite damages the structural and functional integrity of chloroplasts leading to symptom formation and inhibition of photosynthesis. *J Exp Bot.* 2015 Sep;66(19):5881-95. doi: 10.1093/jxb/erv299. Epub 2015 Jun 25. PMID: 26113193; PMCID: PMC4566980.
 11. Anikina I, Kamarova A, Issayeva K, Issakhanova S, Mustafayeva N, Insebayeva M, Mukhamedzhanova A, Khan SM, Ahmad Z, Lho LH, Han H, Raposo A. Plant protection from virus: a review of different approaches. *Front Plant Sci.* 2023 Jun 12;14:1163270. doi: 10.3389/fpls.2023.1163270. PMID: 37377807; PMCID: PMC10291191.
 12. Bettoni JC, Mathew L, Pathirana R, Wiedow C, Hunter DA, McLachlan A, Khan S, Tang J, Nadarajan J. Eradication of *Potato Virus S*, *Potato Virus A*, and *Potato Virus M* From Infected *in vitro*-Grown Potato Shoots Using *in vitro* Therapies. *Front Plant Sci.* 2022 May 19;13:878733. doi: 10.3389/fpls.2022.878733. PMID: 35665190; PMCID: PMC9161163.

13. Palukaitis P, Yoon JY, Choi SK, Carr JP. Manipulation of induced resistance to viruses. *Curr Opin Virol.* 2017 Oct;26:141-148. doi: 10.1016/j.coviro.2017.08.001. Epub 2017 Aug 30. PMID: 28843933.
14. Li C, Brant E, Budak H, Zhang B. CRISPR/Cas: a Nobel Prize award-winning precise genome editing technology for gene therapy and crop improvement. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2021 Apr 15;22(4):253-284. doi: 10.1631/jzus.B2100009. PMID: 33835761; PMCID: PMC8042526.
15. Luhtala N, Parker R. T2 Family ribonucleases: ancient enzymes with diverse roles. *Trends Biochem Sci.* 2010 May;35(5):253-9. doi: 10.1016/j.tibs.2010.02.002. Epub 2010 Feb 26. PMID: 20189811; PMCID: PMC2888479.
16. MacIntosh, G.C. and Castandet, B. (2020). Organellar and Secretory Ribonucleases: Major Players in Plant RNA Homeostasis. *Plant Physiology*, 183(4), pp. 1438–1452.
17. Sangaev, S., Kochetov, A., Ibragimova, S., Levenko B. and Shumny, V. (2011). Physiological Role of Extracellular Ribonucleases of Higher Plants. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 2011, 1 (1), pp. 44–50.
18. Zhirnov, I., Trifonova, E. and Kochetov, A. (2014). Role of auto- and heterologous ribonuclease III family enzymes in the resistance to pathogens: regulation of gene expression in higher plants. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 4(1), pp. 74–81.
19. <https://agscientific.com/blog/rnase-a-faq.html>
20. Thorn K. Genetically encoded fluorescent tags. *Mol Biol Cell.* 2017 Apr 1;28(7):848-857. doi: 10.1091/mbc.E16-07-0504. PMID: 28360214; PMCID: PMC5385933.
21. Sindarovska Y, Kuchuk M. Long-Term Potato Virus X (PVX)-Based Transient Expression of Recombinant GFP Protein in *Nicotiana*

- benthamiana* Culture In Vitro. *Plants* (Basel). 2021 Oct 15;10(10):2187. doi: 10.3390/plants10102187. PMID: 34685995; PMCID: PMC8537016.
22. Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007;18:134–141. doi: 10.1016/j.copbio.2007.03.002.
23. Callaway A, Giesman-Cookmeyer D, Gillock ET, Sit TL, Lommel SA. The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annu Rev Phytopathol.* 2001;39:419-60. doi: 10.1146/annurev.phyto.39.1.419. PMID: 11701872.
24. Adhab M. Be smart to survive: virus-host relationships in nature. *J Microbiol Biotechnol Food Sci.* 2021;6:e3422. doi: 10.15414/jmbfs.3422.
25. Butler PJ, Klug A. Assembly of the particle of tobacco mosaic virus from RNA and disks of protein. *Nat New Biol.* 1971 Jan 13;229(2):47–50.
26. Butler PJ, Bloomer AC, Finch JT. Direct visualization of the structure of the "20 S" aggregate of coat protein of tobacco mosaic virus. The "disk" is the major structure at pH 7.0 and the Proto-helix at lower pH. *J Mol Biol.* 1992 Mar 20;224(2):381–394.
27. Klug A. The assembly of tobacco mosaic virus: structure and specificity. *Harvey Lect.* 1980;74:141–172.
28. Anikina I, Kamarova A, Issayeva K, Issakhanova S, Mustafayeva N, Insebayeva M, Mukhamedzhanova A, Khan SM, Ahmad Z, Lho LH, Han H, Raposo A. Plant protection from virus: a review of different approaches. *Front Plant Sci.* 2023 Jun 12;14:1163270. doi: 10.3389/fpls.2023.1163270. PMID: 37377807; PMCID: PMC10291191.
29. Balachandran S, Hurry VM, Kelley SE, Osmond CB, Robinson SA, Rohozinski J, Seaton GGR, Sims DA. 1997. Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis. *Physiologia Plantarum* 100, 203–213.

30. Bhat S, Folimonova SY, Cole AB, Ballard KD, Lei Z. 2013. Influence of host chloroplast proteins on *Tobacco mosaic virus* accumulation and intercellular movement. *Plant Physiology* 161, 134–147.
31. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P., Han S., Joung J., Belanto JJ та ін. . (2017). Націлювання на РНК за допомогою CRISPR–Cas13. *Nature* 550 (7675), 280–284. doi: 10.1038/nature24049.
32. AlMaarri K., Massa R., AlBiski F. (2012). Evaluation of some therapies and meristem culture to eliminate potato Y potyvirus from infected potato plants. *Plant Biotechnol.* 29, 237–243. doi: 10.5511/plantbiotechnology.12.0215a.
33. Deshpande RA, Shankar V. Ribonucleases from T2 family. *Crit Rev Microbiol.* 2002;28(2):79-122. doi: 10.1080/1040-840291046704. PMID: 12109772.
34. Goodin MM, Zaitlin D, Naidu RA, Lommel SA. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol Plant Microbe Interact.* 2008 Aug;21(8):1015-26. doi: 10.1094/MPMI-21-8-1015. PMID: 18616398.
35. Goodin MM, Zaitlin D, Naidu RA, Lommel SA. *Nicotiana benthamiana*: Its History and Future as a Model for Plant-Pathogen Interactions. *Mol Plant Microbe Interact.* 2015 Jan;2015(1):28-39. doi: 10.1094/MPMI-00-00-1015-REV.testissue. PMID: 27839076.
36. Fodor J, Kámán-Tóth E, Dankó T, Schwarczinger I, Bozsó Z, Pogány M. Description of the *Nicotiana benthamiana*-*Cercospora nicotianae* Pathosystem. *Phytopathology.* 2018 Jan;108(1):149-155. doi: 10.1094/PHYTO-12-16-0448-R. Epub 2017 Nov 13. PMID: 28853320.
37. Murashige T., Skoog F. 1962
38. Jain A. 2020
39. Bertani, 1951

40. 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 (Czech Republic), P. 159.
41. Trifonova, E., Romanova, A., Sangaev, S., Sapotsky, M., Malinovsky, V. and Kochetov, A. (2012). Inducible expression of the gene of *Zinnia elegans* coding for extracellular ribonuclease in *Nicotiana tabacum* plants. *Biologia Plantarum*, 56, (3), pp. 571–574.
42. Derbalah, A.S.H. and Elsharkawy, M., J. Biotechnol., 2019, vol. 306, no. 12, pp. 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.10.003>.
43. Agrios G (2005). Plant Pathology. 5th ed. Burlington: Elsevier Academic Press.
44. Hefferon K. Plant Virus Expression Vectors: A Powerhouse for Global Health. *Biomedicines*. 2017 Jul 30;5(3):44. doi: 10.3390/biomedicines5030044. PMID: 28758953; PMCID: PMC5618302.
45. Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr Opin Biotechnol*. 2007 Apr;18(2):134-41. doi: 10.1016/j.copbio.2007.03.002. Epub 2007 Mar 23. PMID: 17368018.
46. Gleba Y, Marillonnet S, Klimyuk V. Engineering viral expression vectors for plants: the 'full virus' and the 'deconstructed virus' strategies. *Curr Opin Plant Biol*. 2004 Apr;7(2):182-8. doi: 10.1016/j.pbi.2004.01.003. PMID: 15003219.