

ДОСЛІДЖЕННЯ СИСТЕМНОГО ПОШИРЕННЯ GFP-МАРКОВАНИХ ВІРУСОПОДІБНИХ ЧАСТИНОК У ТРАНСГЕННИХ РОСЛИНАХ *NICOTIANA BENTHAMIANA*, ТРАНСФОРМОВАНИХ ГЕНОМ ЕКСТРАКЛІТИНОЇ *ZRNase II*

О.О. ОВЧАРЕНКО *, А.О. ПОТРОХОВ, О.М. ЯРОШКО,
С.В. ЛІТВІНОВ, П.Д. МАЙСТРОВ, В.А. РУДАС, М.В. КУЧУК

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 03143, Україна

E-mail: ovcharenko0077@gmail.com

Автор для кореспонденції – Овчаренко О.О., e-mail: ovcharenko0077@gmail.com

Рослинні віруси призводять до значного зниження врожайності культурних рослин, тому актуальною є розробка нових методів боротьби з вірусними захворюваннями та дослідження ефективності цих методів. Експресія гетерологічного гена екстраклітинної РНКаз *Zinnia elegans* (*ZRNase II*) підвищує стійкість трансгенних рослин до вірусів. Нами було запропоновано модельну систему для візуалізації захисного впливу гена *ZRNase II* та вивчення поширення вірусоподібних частинок, маркованих GFP, в рослинах *Nicotiana benthamiana*. В отриманих методом агробактеріальної трансформації рослинах підтвердили наявність цільового гена *ZRNase II*. Чотири лінії були відібрані та адаптовані до умов *ex vitro*. Загальна РНКазна активність в усіх трансгенних лініях була у 4–8 разів вищою, ніж у рослин дикого типу. Досліджували системне поширення в цих рослинах створеної на основі вірусу картоплі X (PVX) конструкції з GFP. Для цього проводили агроінфільтрацію з векторами *pICH27566* та *pICH6692*. Після агроінфільтрації відбувалася транз'єнтна експресія GFP, та спостерігали його системне поширення по рослині завдяки транспортним білкам вірусу. Експресія гена гетерологічної РНКаз (*ZRNase II*) затримувала поширення вірусоподібних частинок на 5–30 днів та зменшувала накопичення маркованих GFP вірусоподібних частинок в усіх трансгенних лініях порівняно з контролем. Для оцінки швидкої системної відповіді рослини на агроінфільтрацію та експресію вірусу досліджували вміст хлорофілу та антоціанів у листі *N. benthamiana* поза межами зони візуального поширення вірусних часток. Виявили від-

мінності між контрольними та трансгенними рослинами у вмісті антоціанів у відповідь на інфікування. Експресія в рослинах гена *ZRNase II* сповільнювала системне поширення вірусоподібних частинок та призводила до зміни реакції на біотичний стрес на рівні вторинного метаболізму рослини.

Ключові слова: генетична трансформація, *Solanaceae*, *Nicotiana benthamiana*, *Agrobacterium*, PVX-GFP, системне вірусне поширення, стійкість до вірусів.

Вступ. Рослинні вірусні інфекції призводять до значних втрат врожаю та зниження його якості у сільськогосподарських рослин, особливо в умовах кліматичних змін та антропогенного забруднення, коли вірусна інфекція стає додатковим стресовим фактором. Вони здатні завдавати значних економічних збитків сільському господарству та спричинювати руйнівні епіфітотії (Jones, 2021). Наразі, не існує специфічних заходів боротьби з вірусами рослин. Наявні методи передбачають локальні агротехнічні обмеження, боротьбу з переносниками та впровадження високої агротехніки вирощування рослин (Anikina I, 2021). Створення рослин з підвищеним рівнем стійкості до вірусів є важливим завданням, яке сьогодні стоїть перед біотехнологами рослин (див. огляди Kyrychenko and Kovalenko, 2018; Niraula and Fondong 2021; Potrokhov and Ovcharenko, 2024). Одним з цікавих напрямків серед широкого спектру підходів генетичної інженерії, які використовували

для створення стійких до вірусів трансгенних рослин, є використання РНКаз (Potrokhov and Ovcharenko, 2024). Гетерологічна експресія РНКаз різноманітного походження приводила до підвищення стійкості отриманих рослин до вірусів. Особливо перспективним є використання власне рослинних РНКаз, що викликає меншу стурбованість у споживачів, на відміну від генів, клонованих з бактерій, грибів або тварин. Ген *ZRNase II*, що відповідає за біосинтез екстраклітинної РНКаз та починає експресуватися у відповідь на поранення, було успішно клоновано (Ye and Droste, 1996) з майорців чепурних (*Zinnia elegans*). Оскільки РНКаз *Zinnia elegans* є позаклітинною та транспортується в клітині до апопласту, її вплив на вірусну РНК відбувається за межами клітинної мембрани: при інфікуванні або в процесі транспорту вірусних частинок між клітинами рослин. Ген *ZRNase II* було перенесено в рослини родини Solanaceae: *Nicotiana tabacum* (Trifonova et al., 2012), *Solanum tuberosum* (Potrokhov et al., 2021), *Petunia hybrida* (Ovcharenko et al., 2023). Використання цього гену дозволяє створювати біотехнологічні рослини з підвищеною стійкістю до вірусів.

При інфікуванні рослин фітовірусами системні прояви стають помітними лише при достатньо сильному розвитку інфекції, при цьому важко оцінити попередній стан рослини на проміжних стадіях після інфікування. Розвиток генетичної інженерії дозволяє сьогодні конструювати вірусоподібні частинки, які містять елементи природних вірусів, поєднані з репортерними білками, зокрема GFP. Такі системи дозволяють візуалізувати вірусні частинки в клітинах та органах рослин, спостерігати їх поширення по рослині, розвиток вірусної інфекції та/або особливості захисної відповіді (Hong et al., 2023). Для ефективнішої експресії таких вірусних векторів можуть бути застосовані генетичні конструкції, що містять елементи вірусних супресорів сайленсингу (BSC). BSC інгібують механізми сайленсингу, які рослини використовують як один із способів протипушного захисту.

В даній роботі було впроваджено модельну тест-систему: індикаторна рослина – PVX-GFP – супресор сайленсингу для аналізу системного транспорту вірусів в рослинах. Модельна сис-

тема була розроблена з використанням високочутливого до широкого спектру рослинних вірусів (Goodin et al., 2008) індикаторного виду *Nicotiana benthamiana* з геном екстраклітинної РНКаз *ZRNase II*, продукт якого здатний деградувати вірусну РНК. Для цього було отримано трансгенні рослини *N. benthamiana* з цим геном, досліджено системне поширення GFP-маркованих вірусоподібних частинок та деякі особливості вмісту хлорофілу та антоціанів у цих рослинах.

Матеріали і методи. *Рослинний матеріал.* Вихідним матеріалом слугувало насіння тютюну *N. benthamiana* з Національного банку зародкової плазми світової флори Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України (Київ, Україна). Асептичні рослини отримували шляхом поверхневої стерилізації сухого насіння в 70%-вому етанолі (30 с), 10%-вому розчині комерційного препарату «Білизна» (10 хв) та потрійного промивання (по 10 хв) в стерильній дистильованій воді. Простерилізоване насіння висівали на чашки Петрі та пророщували при +26 °C в умовах *in vitro* на агаризованому безгормональному середовищі MS (Murashige and Skoog., 1962). Отримані проростки розсаджували та вирощували в культивацийних посудинах об'ємом 0,5 дм² при освітленості 3000 Лк та фотоперіоді 16/8. Повністю розвинені листки асептичних рослин в подальшому використовували як експланти при агробактеріальній генетичній трансформації.

*Генетичні вектори, штами та умови культивування бактерій *Agrobacterium tumefaciens*.* Для генетичної трансформації *N. benthamiana* використовували *Agrobacterium tumefaciens* штам AGL0 з вектором pBi-RNS. Т-ДНК вектора pBi-RNS включала ген *ZRNase II* S-подібної РНКаз з *Zinnia elegans* і ген неоміцинофосфотрансферази (*npt II*) (рис. 1, а) (Sangaev et al., 2007).

Первинне отримання вірусоподібних частинок PVX-GFP, здатних до системного поширення по рослині, відбувалося при транзйентній експресії у рослинах *N. benthamiana* генів вірусу PVX і GFP, кодованих Т-ДНК вектора pICH27566 (рис. 1, б) (Denkovskienė et al. 2015). В цю конструкцію були інкорпоровані гени елементів PVX, зокрема ті, що кодують компоненти вірусних частинок: вірусну РНК-полімеразу, білки потрійного генного блоку 25k,

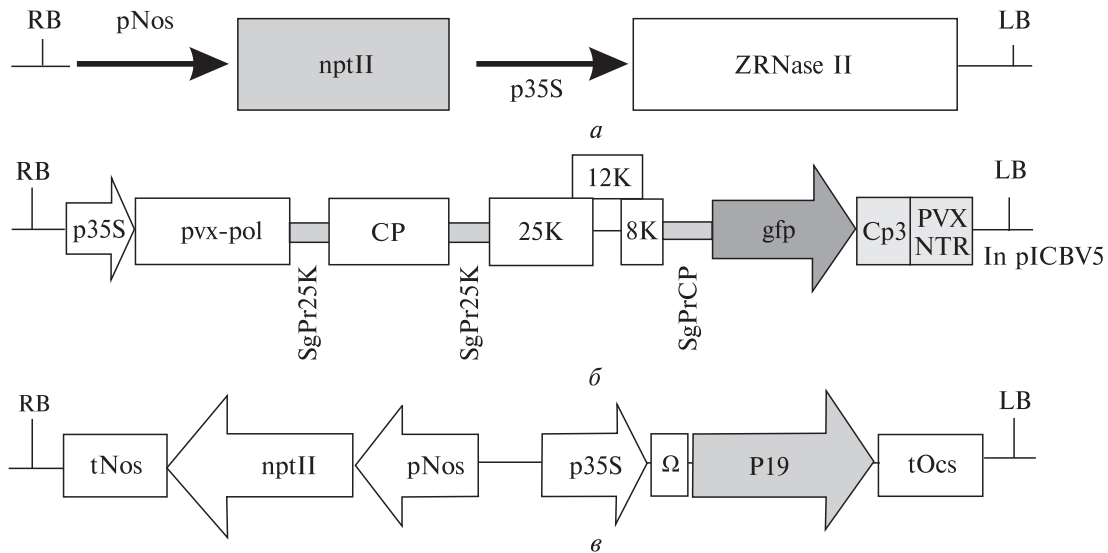


Рис. 1. Схеми Т-ДНК векторів, використаних в роботі. *а* – pbi-RNS: LB, RB – ліва та права фланкуючі послідовності; pNOS – промотор нопаїнсинтази; *npt II* – ген неоміцинофотрансферази II; p35S – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV), *ZRNase II* – ген S-подібної РНКазы з *Zinnia elegans*; *б* – pICH27566: 35S–35S промотор CaMV; *pvx-pol* – ген РНК полімерази PVX; 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'-кінець білка оболонки PVX; PVX NTR – 3'UTR PVX; *в* – pICH6692: Ω-5' омега нетрансльований регіон; *p19* – ген білка P19 (супресор сайленсингу); *ocsT* – термінатор октапінсинтази; pNos, tNos – промотор і термінатор нопаїнсинтази; *npt II* – ген неоміцинофотрансферази II

12k, *8k*, білок оболонки, а також ген репортерного білка GFP. Для попередження потенційного РНК-індукованого «мовчання» генів при агроінфільтрації конструкцією pICH27566 використовували допоміжний генетичний вектор pICH6692, який містив супресор посттранскрипційного сайленсингу генів p19 з вірусу куцистої карликовості томатів (Tomato bushy stunt virus), керований 35S промотором вірусу CaMV (рис. 1С) (Marillonnet et al. 2005). Вектори pICH27566 та pICH6692, перенесені окремо в бактерії штаму GV3101 *A. tumefaciens*, були люб'язно надані для наукових цілей компанією Icon Genetics GmbH I. L. (Галле, Німеччина).

Agrobacterium tumefaciens штаму AGL0 з вектором pbi-RNS культивували на середовищі LB (Bertani G, 1951) з додаванням 50 мг/дм³ рифампіцина та 100 мг/дм³ канаміцина. Вектори pICH27566 та pICH6692 клонували окремо в штамі GV3101 *A. tumefaciens* у присутності 50 мг/дм³ рифампіцина, 25 мг/дм³ гентаміцина та 100 мг/дм³ канаміцина, або 50 мг/дм³ рифампіцина, 25 мг/дм³ гентаміцина та 100 мг/дм³

карбеніциліна, відповідно. Отриману бактеріальну культуру вирощували впродовж 24 год при температурі +27 °С при постійному перемішуванні бактеріальної суспензії на шейкері у режимі 150 об/хв. Після нарощування бактеріальні клітини осаджували в стерильних центрифужних пробірках при 5000 об/хв впродовж 10 хв. Для генетичної трансформації осад ресуспендували в розчині 10 ммоль MgSO₄, а для створення шляхом транз'єнтної експресії в рослинах вірусоподібних частинок PVX– в інфільтраційному буфері (10 ммоль MES, рН = 5,6, 10 ммоль MgSO₄, 100 мкмоль ацетосирингону).

Генетична трансформація рослин. Агробактеріальну генетичну трансформацію рослин *N. benthamiana* проводили методом листкових дисків за стандартною методикою (Horsch et al., 1985). Після співкультивування з *A. tumefaciens* експланти листків *N. benthamiana* переносили на агаризоване середовище MS з додаванням 600 мг/дм³ цефотаксиму та 100 мг/дм³ канаміцину в присутності фітогормонів БАП 1 мг/дм³ та НОК 0,1 мг/дм³. Субкультивування прово-

дили кожні два тижні. Після 10 пасажів регенеранти культивували на середовищі без цефатоксиму лише з канаміцином для селекції трансгенних рослин.

Молекулярно-біологічний аналіз. Підтвердження присутності вставки Т-ДНК з генами *ZRNase II* та *npt II* у отриманих стійких до канаміцину рослин проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Аналізували сумарну рослинну ДНК, екстраговану з листової тканини. ДНК виділяли згідно методики (Doyle and Doyle, 1990). Як позитивний контроль для реакції ампліфікації використовували плазмідну ДНК. Реакційна суміш містила ПЛР-буфер, 0,2 мкмоль відповідних праймерів, 200 мкмоль кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів, 0,5 од Taq-полімерази, 50 нг проби сумарної рослинної ДНК. Загальний об'єм суміші становив 20 мкл. Умови ампліфікації з праймерами до генів *ZRNase II* та *npt II* наведено в роботі Ovcharenko et al. (2023). Послідовність праймерів представлена в таблиці 1.

Зразки фракціонували в 1%-вому агарозному гелі у лігій-боратному буфері LB (Brody et al., 2004). Як маркер молекулярної маси та розміру використовували 1 kb Thermo Scientific GeneRuler з розміром фрагментів 250–10000 п.н.

Адаптація та вирощування рослин у тепличних умовах. Вирощені in vitro рослини висаджували в касети з субстратом TS1 у вологу камеру. Після акліматизації вкорінені рослини перевалювали в горщики Р9. В теплиці підтримували освітленість 15000 Люкс, 16-годинний світловий період, температуру +24 °С.

Визначення РНКазної активності. Дослідження РНКазної активності проводили з використанням орцину (Jain et al., 2020). Для цього 400 мг листя рослин гомогенізували в охолоджену буфері 0,05 М трис НСІ (рН 7,5) з додаванням 0,15 М NaCl та 1 мМ N-етилmaleїміду. Загальний об'єм інкубаційної суміші ста-

новив 3 мл. Гомогенат центрифугували 20 хв при 6000 об/хв. Аліквоти отриманих екстрактів використовували для визначення РНКазної активності. Для цього 0,5 мл екстракту інкубували 6 та 66 хв при +31 °С та додавали 1 мл 34%-вої НСІО₄, після чого центрифугували 20 хв при 6000 об/хв. До розчину додавали 1 мл орцинового реактиву. Розчин охолоджували та вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 670 нм.

Визначення особливостей розвитку системного вірусного поширення у рослин *N. benthamiana*, що експресують ген *ZRNase II*. Первинне отримання вірусоподібних частинок PVX-GFP відбувалося після агроінфільтрування рослин сумішшю аліквот (1 : 1) агробактеріальної суспензії *A. tumefaciens* штаму GV3101, що містила векторні конструкції pICH27566 та pICH6692. Процедура агроінфільтрації полягала в тому, що бактеріальні суспензії з векторами pICH27566 та pICH6692, вирощені та осаджені як описано вище, ресуспендували в інфільтраційному буфері до OD₆₀₀ = 1,0. Буфер без агробактеріальних клітин, або з клітинами *Agrobacterium*, що несуть лише плазмиду з геном *p19* (pICH6692) використовували як контроль при отриманні вірусоподібних частинок. Листя агроінфільтрували за допомогою безголкового шприца в перший від верхівки повністю розвинений листок. Поширення вірусоподібних частинок по рослині виявляли візуально за флуоресценцією GFP (пік екситації – 488 нм).

Визначення вмісту антоціанів та хлорофілу в рослинах *Nicotiana benthamiana*, що експресують ген *ZRNase II*. Для визначення вмісту хлорофілу та антоціанів використовували портативний аналізатор Opti-Sciences MPM-100 (Opti-Sciences, США).

Статистична обробка. Для обробки статистичних даних використовували пакет програм MS Excel 2016 (Microsoft, США) та програму

Послідовність праймерів, що використовували для ампліфікації генів *ZRNase II* та *npt II*

Назва гена	Послідовності праймерів	Розмір очікуваного амплікона, п.н.
<i>ZRNase II</i>	5'- ACACTCGAAGCACACAAACATGAAGA-3' 5'- GAATCTAGAAATTTAGAATGAAGGA-3'	720
<i>npt II</i>	5'-GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG-3' 5'-ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA-3'	700

STATISTICA-5.5 (StatSoft, США). Експерименти повторювали тричі для отримання статистично достовірних даних. В кожній групі використовували не менше 10 рослин.

Результати і обговорення. Генетична трансформація рослин *N. benthamiana* та їх молекулярно-біологічний аналіз. Агробактеріальна генетична трансформація *N. benthamiana* є рутинною процедурою, тому її проводили за стандартною методикою (Horsch, et al., 1985). Для отримання трансгенних рослин листкові диски з асептичних рослин, вирощених *in vitro*, співкультивували з агробактеріальною суспензією. Після співкультивування експланти переносили на агаризоване середовище MS з додаванням 600 мг/дм³ цефотаксиму для елімінації агробактеріальних клітин та 100 мг/дм³ канаміцину для селекції в присутності фітогормонів БАП 1 мг/дм³ та НОК 0,1 мг/дм³.

На селективному середовищі протягом двох місяців відбувалася регенерація стійких пагонів. Відокремлені від експлантів пагони переносили на безгормональне селективне середовище для вкорінення. Пагони, що інтенсивно росли та вкорінювалися відбирали для молекулярно-біологічного аналізу, як потенційно трансгенні. Отримані рослини фенотипово не відрізнялися від контрольних рослин.

Присутність селективного (*npt II*) та цільового (*ZRNase II*) генів у *N. benthamiana* була підтверджена методом ПЛР-аналізу з відповідними праймерами. Всі проаналізовані лінії містили обидва гени. Результати ампліфікації з праймерами до гена *ZRNase II* показано на рис. 2.

Адаптація рослин *N. benthamiana* до умов теплиці та їх вирощування. Чотири трансгенні лінії з підтвердженою присутністю гена *ZRNase II* були розмножені *in vitro* та перенесені в умови теплиці. Ефективність адаптації рослин *N. benthamiana* становила 90 %. Після адаптації визначали загальну РНКазну активність в листках.

Визначення загальної РНКазної активності в трансформованих рослинах *N. benthamiana*. При дослідженні загальної РНКазної активності в рослинах *N. benthamiana* з геном *ZRNase II* було встановлено, що трансгенні рослини мали значно вищий рівень активності, порівняно з контрольними рослинами дикого типу (рис. 3).

Виявлено, що в лініях RNS1 та RNS2 загальна РНКазна активність була у 8 разів ви-

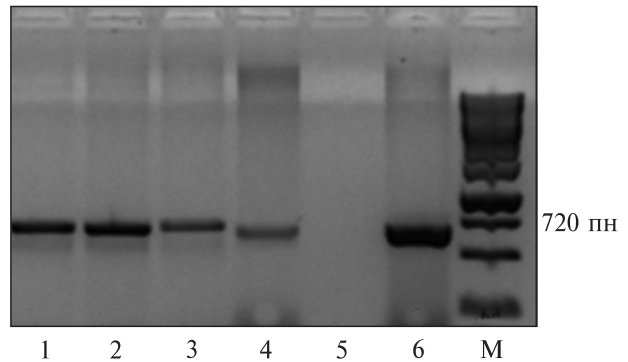


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації з праймерами, специфічними до гена *ZRNase II* в рослинах *N. benthamiana*. 1–4 – трансгенні рослини *N. benthamiana*; 5 – не трансгенний контроль; 6 – плазмідна ДНК; М – молекулярний маркер GeneRuler™ DNA Ladder Mix

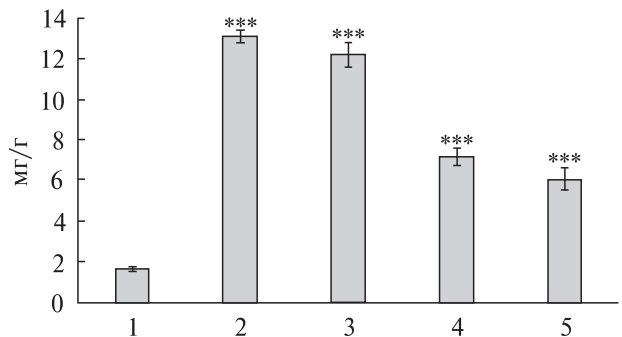


Рис. 3. Загальна активність РНКаз в екстрактах листя *N. benthamiana*; 1 – контрольні рослини дикого типу; 2–5 – лінії з геном *ZRNase II* *** $P \leq 0,001$

щою ніж в контролі, а в лініях RNS3 і RNS4 активність була вищою приблизно у 4 рази. Отже, було показано, що трансформовані рослини *N. benthamiana*, які несли ген *ZRNase II*, мали вищі рівні активності РНКаз порівняно з рослинами дикого типу.

Візуалізація взаємодії вірус-рослина за допомогою детекції білка GFP. Маркування рослинних вірусів є поширеною експериментальною стратегією для дослідження багатьох аспектів динаміки вірусної інфекції. Зазвичай, такими репортерами є флуоресцентні білки (Baulcombe et al., 1995). Також відомо про використання репортерного транскрипційного фактора MYB, який активує біосинтез антоціанів, в якості маркера для візуального поширення вірусних часток по рослинам та відстеження вірусної ін-

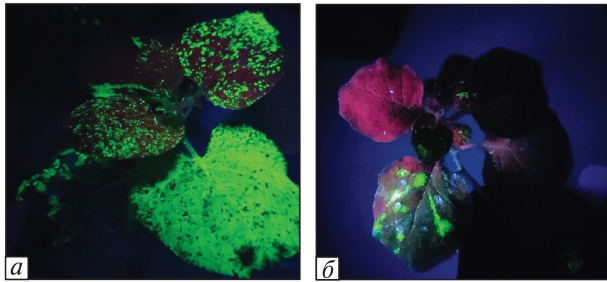


Рис. 4. Флуоресценція GFP в рослинах *N. benthamiana* агроінфільтрованих конструкціями pICH27566 та pICH6692, які містять гени вірусу PVX, GFP та вірусного супресора сайленсингу через 3 тижні після агроінфільтрації. Модель демонструє противірусний захисний ефект в присутності гена *ZRNase II*, який сповільнював поширення вірусних часток по рослині. *a* – рослини *N. benthamiana* дикого типу; *б* – трансгенна рослина *N. benthamiana* з геном *ZRNase II*, лінія RNS3

фекції (Bedoya et al., 2012). Модифіковані вірусні вектори можуть бути доставлені до тканин рослин за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* (агроінфекції) (Marillonnet et al., 2004; 2005). В результаті відбувається системна трансфекція вірусних репліконів, опосередкована *A. tumefaciens*, для ефективної транзиторної експресії компонентів маркованих вірусних частинок у рослинах (Marillonnet et al., 2005).

Запропонована нами модельна система вірус-трансгенна рослина представляла собою вирощені стабільно трансформовані рослини *N. benthamiana* з геном *ZRNase II*, які в умовах теплиці інфільтрували суспензією агробактерій з генетичним вектором, що містив в своєму складі генетичні послідовності, які кодуєть елементи вірусу картоплі Х (PVX) та ген *gfp*. Продукт цього гена – зелений флуоресцентний білок (GFP) флуоресцює при опроміненні далеким синім світлом з довжиною хвилі 488 нм, що дозволяє візуально оцінити розповсюдження вірусу по рослині у реальному часі. Вектор pICH6692 посилює експресію та системне поширення маркованих вірусоподібних частинок завдяки супресії сайленсингу (Marillonnet et al., 2005). Білок P19, що кодується вірусом кущистої карликовості томатів (TBSV), є потужним супресором сайленсенгу, який пригнічує РНК-інтерференцію (RNAi), утворюючи гомодимери, які зв'язуються з siRNA, що продукую-

ється ендонуклеазою Dicer. Зв'язування siRNA за допомогою P19 запобігає програмуванню RISC цими молекулами, пригнічуючи ендонуклеазну активність RISC та перешкоджаючи деградації РНК, комплементарних до siRNA (Chiong et al., 2021). Екзогенна експресія P19 підвищує інфекційність вірусних векторів з геном зеленого флуоресцентного білка (GFP) та значно посилює експресію GFP (Wang et al., 2023).

Після агроінфільтрації спостерігали транзиторну експресію білка GFP у сайті агроінфільтрації та подальше системне поширення по рослині з вірусоподібними частинками завдяки транспортним білкам вірусу (рис. 4). Встановлено, що флуоресценція GFP вперше з'являлася у зоні первинної інокуляції на 5–6 день після агроінфільтрації та не відрізнялася у трансгенних (з геном *ZRNase II*) і контрольних рослин. Ці результати співпадали з результатами, отриманими (Grishina et al., 2021) для не трансгенних рослин *N. benthamiana*.

Вірусоподібні частинки поширювалися в ділянках поза зоною первинної інокуляції. Флуоресценція GFP, яка поширювалася за межі зони інфільтрації, свідчила про системне поширення вірусоподібних частинок, що в рослинах дикого типу спостерігали на другий тиждень після агроінфільтрації. В подальшому, найінтенсивнішу флуоресценцію GFP спостерігали в судинних пучках, зокрема центральних та бічних жилках листків, та в молодих листках.

У трансгенних лініях розвиток системної вірусної інфекції відрізнявся. У рослин лінії RNS1 зони флуоресценції GFP поза зоною первинної інфільтрації з'являлися в листі другого і третього ярусів над інокульованим листком на 5–6 днів пізніше, порівняно з не трансгенними контрольними рослинами. Це вказує на те, що системне поширення вірусоподібних частинок затримувалося. В трансгенній лінії RNS2 спостерігали флуоресценцію GFP у листках другого та третього ярусів, на 7–9-й день після появи аналогічних симптомів поширення інфекції у рослинах дикого типу. Через 14–15 днів вірусні частки досягали наймолодшого листа. Системне поширення вірусоподібних часток найпізніше починалося у рослинах ліній RNS3 та RNS4. Так, у лінії RNS3 чітко виражене системне ураження спостерігали на місяць пізніше, ніж у рослинах дикого типу. Не-

зважаючи на вищу загальну РНКазну активність у трансгенних лініях RNS1 та RNS2, розвиток вірусної інфекції у них затримувався менше порівняно з RNS3 та RNS4. В цьому дослідженні визначали загальний рівень активності РНКаз, але, можна припустити, що оскільки РНКаза майорців є екстраклітинною, і має транспортуватися в апопласт, то могли бути відмінності між лініями в рівнях накопичення саме екстраклітинних РНКаз, які окремо не визначали. Рівні екстраклітинної та загальних РНКаз не обов'язково корелюють між собою. Активність екстраклітинної РНКази залежить від експресії гена *ZRNase II*, яка може бути пов'язаною з позиційним ефектом вбудовування трансгена, та від особливостей транспорту РНКази в апопласт.

Таким чином, швидкість розвитку вірусної інфекції та її інтенсивність у рослинах відрізнялися між трансгенними лініями. Поширення вірусних часток, яке візуалізували за світінням GFP, у рослинах, що містили ген екстраклітинної РНКази (*ZRNase II*) затримувалося на 5–30 днів та було значно менш інтенсивним порівняно з контрольними рослинами дикого типу.

Визначення вмісту антоціанів та хлорофілів у трансгенних рослинах *N. benthamiana*. Відомо, що системне поширення PVX в рослинах *N. benthamiana* залежить від генів по-в'язаних з фотосинтезом (Yang et al., 2020). Агроінфільтрація, застосована для внесення у клітину ДНК, з якої в рослинах мають синтезуватися вірусоподібні частинки, та їх безпосередній синтез і поширення здатні впливати на метаболізм рослин. Нами було проаналізовано показники, які характеризують первинний і вторинний метаболізм рослин. Для цього визначали вміст хлорофілів і антоціанів після агроінфільтрації за допомогою портативного флуориметра Opti-Sciences MPM-100. Останній вимірює загальний вміст хлорофілу в досліджуваному зразку, але не дозволяє розрізнити його вміст за типами. Аналіз результатів показав, що вміст хлорофілу підвищувався в усіх інфікованих рослинах. Підвищення вмісту хлорофілів було притаманне як для рослин дикого типу, так і для трансгенних ліній (рис. 5).

Антоціани часто є показниками розвитку стресових реакцій в рослинах і можуть бути асоційовані з антиоксидантною активністю. Ана-

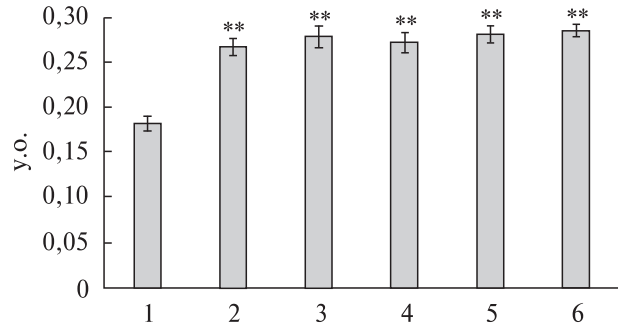


Рис. 5. Вміст хлорофілів в рослинах *N. benthamiana*, після інфільтрації агробактерією з векторними конструкціями pICH27566 та pICH6692. 1 – не інфіковані рослини дикого типу; 2 – інфіковані рослини дикого типу; 3–6 – інфіковані трансгенні лінії *N. benthamiana*. ** $P \leq 0,01$

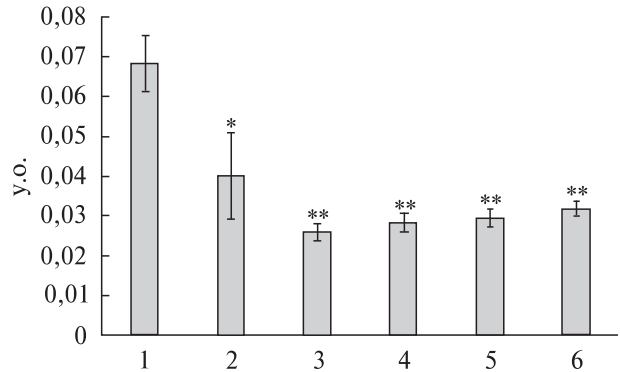


Рис. 6. Вміст антоціанів в рослинах *N. benthamiana*, інфільтрованих агробактерією з генетичними векторами pICH27566 та pICH6692: 1 – не інфіковані рослини дикого типу; 2 – інфіковані рослини дикого типу; 3–6 – інфіковані трансгенні лінії *N. benthamiana*. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$

ліз вмісту антоціанів показав, що після інфікування вміст антоціанів знижувався в 1,7–2,7 рази. Вміст антоціанів у інфікованих трансгенних лініях знижувався сильніше порівняно з контрольними рослинами дикого типу (рис. 6).

Зазвичай, інфікування природними вірусами призводить до зменшення фотосинтетичної продуктивності, зменшення синтезу хлорофілів та посилення синтезу антоціанів, особливо у випадку змішаних інфекцій (Pollari et al., 2022). Хоча в деяких роботах показана відсутність впливу моноінфекції PVX на вміст хлорофілу (García-Marcos et al., 2009). Інокуляція PVX збільшувала експресію генів фенолпропаноїдів

у не трансгенному листі тютюну в роботі (Park et al., 2022). Однак, у листі трансгенного тютюну з геном *AtPAP1*, який відповідає за суперекспресію антоціанів, інокуляція PVX знизила експресію гена *AtPAP1*, і як наслідок — синтез фенілпропаноїдів та продукцію антоціанів. Інфекція PVX знижувала експресію трансгена, що призводило до зниження біосинтезу фенілпропаноїдів та флавоноїдів у трансгенних рослинах (Park et al., 2022).

У нашій системі був присутній комбінований вплив *Agrobacterium* та вірусоподібних часток. Ми досліджували вміст хлорофілу та антоціанів у листі *N. benthamiana* поза межами зони інфільтрації агробактерією до моменту візуального поширення туди вірусних часток. Отримані дані можуть характеризувати швидку системну відповідь рослини на агроінфільтрацію та експресію вірусу. Поєднання таких чинників могло вплинути на реакцію рослин, а тому потребує подальшого вивчення. В цілому, отримані результати дозволяють припустити, що експресія в рослинах гена *ZRNase II* не лише сповільнювала системне поширення вірусоподібних частинок, але і призводила до зміни стійкості до дії біотичного стресу, на рівні вторинного метаболізму рослини.

Висновки. В даній роботі вивчали вплив гетерологічної екстраклітиної РНКази майорців, кодованої геном *ZRNase II*, на системне поширення вірусів типу PVX у рослинах *N. benthamiana*. Експресія цього гена призводить до підвищення активності екстраклітинних РНКаз у трансгенних рослинах, що впливає на вірусну РНК та зменшує симптоми ураження. Для візуалізації та аналізу поширення інфекційного процесу, зокрема системного транспорту вірусоподібних частинок в трансгенних рослинах з геном *ZRNase II*, була використана модельна тест-система з рекомбінантним вірусом PVX-GFP, який містить інтегрований білок GFP. Створена чутлива модельна система вірус-рослина показала, що в трансгенних рослинах *N. benthamiana* з геном *ZRNase II* відбувається затримка системного поширення та інтенсивності розвитку вірусної інфекції порівняно з рослинами дикого типу. Використання гена *ZRNase II* для трансформації рослин є перспективним для подальших досліджень,

націлених на створення вірусостійких культурних рослин.

Дотримання етичних норм. Ця робота не містить жодних досліджень за участю людей або тварин.

Конфлікт інтересів. Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. III-5-22 «Механізми стресової адаптації та створення стійких ліній рослин методами генетичної інженерії», III-5-25 «Біотехнології для підвищення стресостійкості рослинних систем та їх використання для фіторе-medіації», відомчої теми НАН України (держреєстрація № 0123U100462).

STUDY OF SYSTEMIC SPREAD OF GFP-LABELED VIRUS-LIKE PARTICLES IN TRANSGENIC *NICOTIANA BENTHAMIANA* PLANTS, TRANSFORMED WITH THE EXTRACELLULAR ZRNASE II GENE

O.O. Ovcharenko, A.O. Potrokhov, O.M. Yaroshko,
S.V. Litvinov, P.D. Maystrov, V.A. Rudas, M.V. Kuchuk
Institute of Cell Biology and Genetic Engineering
of the National Academy of Sciences of Ukraine
148 Akademika Zabolotnoho Street, 03143, Kyiv,
Ukraine

E-mail: ovcharenkooo77@gmail.com

Plant viruses significantly decrease the yield of cultivated plants; therefore, developing new methods of combating viral diseases and studying the effectiveness of these methods is relevant. The expression of the heterologous extracellular RNase gene of *Zinnia elegans* (*ZRNase II*) increases the resistance of transgenic plants to viruses. We have proposed a model system for visualizing the protective effect of the *ZRNase II* gene and studying the spread of GFP-marked viral particles in *Nicotiana benthamiana* plants. The presence of the target *ZRNase II* gene was confirmed in the plants obtained after *Agrobacterium*-mediated transformation. Four lines were selected and adapted to ex vitro conditions. Total RNase activity in all transgenic lines was 4–8 times higher than in wild-type plants. We studied the systemic spread of the Potato virus X-based PVX-GFP construct in these plants. To this end, agroinfiltration was performed using the pICH27566 and pICH6692 vectors. Following agroinfiltration, transient expression of GFP occurred, spreading systemically throughout the plant due to transport proteins within the virus-like particles. Expression of the heterologous RNase gene (*ZRNase II*) delayed the spread of viral particles for 5–30 days, and reduced the accumulation of GFP-marked viral particles in all transgenic lines compared to the control. To assess

the rapid systemic response of plants to agroinfiltration and virus expression, the content of chlorophyll and anthocyanins in *N. benthamiana* leaves was studied outside the zone of visual spread of GFP-marked viral particles. Differences were found between control and transgenic plants in terms of anthocyanin content in response to infection. Expression of the RNase II gene in plants delayed the systemic spread of virus-like particles, and altered the response to biotic stress at the level of plant secondary metabolism.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Anikina, I., Kamarova, A., Issayeva, K., et al. Plant protection from virus: a review of different approaches. *Frontiers in Plant Science*, 2023, vol. 14, pp. 1163270. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1163270>
- Baulcombe, D.C., Chapman, S., and Santa Cruz, S., Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *The Plant Journal*, 1995, vol. 7, no. 6, pp. 1045–1053. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.1995.07061045.x>
- Bedoya, L.C., Martínez, F., Orzáez, D., and Daròs, J.A., Visual tracking of plant virus infection and movement using a reporter MYB transcription factor that activates anthocyanin biosynthesis. *Plant physiology*, 2012, vol. 158, no. 3, pp. 1130–1138. <https://doi.org/10.1104/pp.111.192922>
- Bertani, G., Studies on lysogenesis I: the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1951, vol. 62, no. 3, pp. 293–300. <https://doi.org/10.1128/jb.62.3.293-300.1951>
- Brody, J.R., Calhoun, E.S., Gallmeier, E., Creavalle, T.D., and Kern, S.E., Ultra-fast high-resolution agarose electrophoresis of DNA and RNA using low-molarity conductive media. *BioTechniques*, 2004, vol. 37, no. 4, pp. 598–602. <https://doi.org/10.2144/04374ST04>
- Chiong, K.T., Cody, W.B., and Scholthof, H.B., RNA silencing suppressor-influenced performance of a virus vector delivering both guide RNA and Cas9 for CRISPR gene editing. *Sci. Rep.*, 2021, vol. 11, pp. 6769. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85366-4>
- Denkovskienė, E., Paškevičius, Š., Werner, S., Gleba, Y., and Ražanskienė, A., Inducible expression of *Agrobacterium* virulence gene *VirE2* for stringent regulation of T-DNA transfer in plant transient expression systems. *Molecular plant-microbe interactions*, 2015, vol. 28, no. 11, pp. 1247–1255. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-05-15-0102-R>
- Doyle, J.J., and Doyle, J.L., Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, vol. 12, pp. 13–15
- García-Marcos, A., Pacheco, R., Martíáez, J., González-Jara, P., Díaz-Ruiz, J. R., and Tenllado, F., Transcriptional changes and oxidative stress associated with the synergistic interaction between Potato virus X and Potato virus Y and their relationship with symptom expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2009, vol. 22, no. 11, pp. 1431–1444. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-11-1431>
- Goodin, M.M., Zaitlin, D., Naidu, R.A., and Lommel, S.A., *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Molecular plant-microbe interactions*, 2008, vol. 21, no. 8, pp. 1015–1026. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-8-1015>
- Grishina, A., Sherstneva, O., Grinberg, M., et al. Pre-symptomatic detection of viral infection in tobacco leaves using pam fluorometry. *Plants*, 2021, vol. 10, no. 12, pp. 2782. <https://doi.org/10.3390/plants10122782>
- Hong, Y., Zheng, Q., Cheng, L., Liu, P., Xu, G., Zhang, H., and Zhou, H., Identification and characterization of TMV-induced volatile signals in *Nicotiana benthamiana*: Evidence for JA/ET defense pathway priming in congeneric neighbors via airborne (E)-2-octenal. *Functional & Integrative Genomics*, 2023, vol. 23, no. 3, pp. 272. <https://doi.org/10.1007/s10142-023-01203-z>
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Wallroth, M., Eichholtz, D., Rogers, S.G., and Fraley, R.T., A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 1985, vol. 227, no. 4691, pp. 1229–1231. <https://doi.org/10.1126/science.227.4691.1229>
- Jain, A., Jain, R., and Jain, S., Estimation of RNA using orcinol method. In: *Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology*. Springer Protocols Handbooks. Humana, New York, 2020, pp. 73–75. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9861-6_23
- Jones, R.A.C., Global plant virus disease pandemics and epidemics. *Plants*, 2021, vol. 10, pp. 233. <https://doi.org/10.3390/plants10020233>
- Kyrychenko, A.M., Kovalenko, O.G., Basic engineering strategies for virus-resistant plants. *Cytol. Genet.*, 2018, vol. 52, pp. 213–221. <https://doi.org/10.3103/S0095452718030076>
- Marillonnet, S., Giritch, A., Gils, M., Kandzia, R., Klimyuk, V., and Gleba, Y., In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, vol. 101, no. 18, pp. 6852–6857. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0400149101
- Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V., and Gleba, Y., Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature biotechnology*, 2005, vol. 23, no. 6, pp. 718–723. <https://doi.org/10.1038/nbt1094>

- Murashige, T., and Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 1962, vol. 15, no. 3, pp. 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Niraula, P.M., and Fondong, V.N., Development and adoption of genetically engineered plants for virus resistance: Advances, opportunities and challenges. *Plants*, 2021, vol. 10, no. 11, pp. 2339. <https://doi.org/10.3390/plants10112339>
- Ovcharenko, O., Potrokhov, A., Sosnovska, D., et al. Increased Virus Resistance in Transgenic Petunia with Heterologous ZRNase II gene. *Jordan J. Biol. Sci.*, 2023, vol. 16, no. 4. pp. 587–592. <https://doi.org/10.54319/jjbs/160403>
- Park, C.H., Yeo, H.J., Lim, H.S., Hyeon, H., Kim, J.K., and Park, S.U., Gene expression and metabolic analyses of nontransgenic and *AtPAP 1* transgenic tobacco infected with Potato Virus X (PVX). *J. Agric. Food Chem.*, 2022, vol. 70, no. 19, pp. 5838–5848. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c00974>
- Pollari, M., Sipari, N., Poque, S., Himanen, K., and Mäkinen, K., Effects of poty-potexvirus synergism on growth, photosynthesis and metabolite status of *Nicotiana benthamiana*. *Viruses*, 2022, vol. 15, no. 1, pp. 121. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz565>
- Potrokhov, A., Sosnovska, D., Ovcharenko, O., Budzanivska, I., Rudas, V., and Kuchuk, M., Increased ribonuclease activity in *Solanum tuberosum* L. transformed with heterologous genes of apoplastic ribonucleases as a putative approach for production of virus resistant plants. *Turkish J. Biology*, 2021, vol. 45, no. 1, pp. 79–87. <https://doi.org/10.3906/biy-2007-87>
- Potrokhov, A.O., and Ovcharenko, O.O., Strategies for engineering of virus-resistant plants: focus on RNases. *Cytol. Genet.*, 2024, vol. 58, no. 2, pp. 99–114. <https://doi.org/10.3103/S0095452724020099>
- Sangaev, S.S., Trifonova, E.A., Titov, S.E., Romanova, A.V., Kolodyazhnaya, Y.S., Komarova, M.L., and Shumny, V.K., Effective expression of the gene encoding an extracellular ribonuclease of *Zinnia elegans* in the SR1 *Nicotiana tabacum* plants. *Russian J. Genetics*, 2007, vol. 43, no. 7, pp. 831–833. <https://doi.org/10.1134/S1022795407070186>
- Trifonova, E.A., Romanova, A.V., Sangaev, S.S., Sapotsky, M.V., Malinovsky, V.I., and Kochetov, A.V., Inducible expression of the gene of *Zinnia elegans* coding for extracellular ribonuclease in *Nicotiana tabacum* plants. *Biologia plantarum*, 2012, vol. 56, no. 3, pp. 571–574. <https://doi.org/10.1007/s10535-011-0206-4>
- Wang, Z., Cao, S., Xu, X., He, Y., Shou, W., Munaiz, E.D., and Shen, J. Application and expansion of virus-induced gene silencing for functional studies in vegetables. *Horticulturae*, 2023, vol. 9, no. 8, pp. 934. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9080934>
- Yang, X., Lu, Y., Wang, F., Chen, Y., Tian, Y., Jiang, L., and Yan, F., Involvement of the chloroplast gene ferredoxin 1 in multiple responses of *Nicotiana benthamiana* to Potato virus X infection. *J. Exper. Bot.*, 2020, vol. 71, no. 6, pp. 2142–2156. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz565>
- Ye, Z.H., and Droste, D.L., Isolation and characterization of cDNAs encoding xylogenesis-associated and wounding-induced ribonucleases in *Zinnia elegans*. *Plant Mol. Biol.*, 1996, vol. 30, no. 4, pp. 697–709. <https://doi.org/10.1007/BF00019005>

Надійшла в редакцію 12.12.2025
Після доопрацювання 05.01.2026
Прийнята до друку 18.05.2026