

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
“ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ”

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

БУЗІАШВІЛІ АНАСТАСІЯ ЮРІЇВНА

УДК 633.85: 581.1+581.4: 58.084.

ДИСЕРТАЦІЯ

**ОТРИМАННЯ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ РОСЛИН РОДИНИ
SOLANACEAE З ГЕНОМ ЛАКТОФЕРИНУ ЛЮДИНИ ДЛЯ
ПІДВИЩЕННЯ ЇХ СТІЙКОСТІ ДО ФІТОПАТОГЕНІВ**

03.00.20 – біотехнологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

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

А.Ю.Бузіашвілі

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент
НАН України Алла Іванівна Ємець

Київ – 2020

АНОТАЦІЯ

Бузіашвілі А.Ю. Отримання генетично модифікованих рослин родини Solanaceae з геном лактоферину людини для підвищення їх стійкості до фітопатогенів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія (091 – біологія). ДУ “Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України”, Київ, 2020.

Одними із лідерів за споживанням серед овочевих культур по всьому світі, та, зокрема, в Україні, є томати (*Lycopersicon esculentum* Mill.) та картопля (*Solanum tuberosum*). Вирощування даних культурних рослин в умовах відкритого та закритого ґрунту пов’язане із небезпекою їх зараження бактеріальними та грибними патогенами, які здатні знищувати до 30-80% врожаю. Саме тому, актуальним є створення нових сортів томатів та картоплі, стійких до широкого спектру бактеріальних та грибних патогенів. Одним із можливих шляхів вирішення цього питання могло би бути створення сортів рослин, що експресують ген лактоферину людини (*hLf*). Лактоферин – це білок із родини трансферинів, який міститься в молоці, слині, сльозах, та інших секреторних рідинах ссавців. Окрім здатності зв’язувати та переносити йони Fe^{2+} та Fe^{3+} , цей білок володіє антибактеріальною, противірусною, фунгістатичною, антипротозойною, нематостатичною, та іншими властивостями. В попередніх дослідженнях із генетичної трансформації генами лактоферину деяких видів рослин було показано підвищення їх стійкості до фітопатогенів різної природи. Отже, перенесення гена лактоферину людини в геном промислово цінних сортів томатів та картоплі могло би підвищити їх стійкість до широкого спектру фітопатогенів. Саме тому, метою даного дослідження було перенесення шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації гена лактоферину людини у геноми 3 сортів томатів (Money

Maker, Лагідний та Перлина) та 4 українських сортів картоплі (Вернісаж, Левада, Світанок Київський та Зарево), для підвищення їх стійкості до деяких бактеріальних та грибних хвороб.

Хоча минуло вже більше 30 років з часу отримання перших генетично модифікованих рослин томатів, *Agrobacterium*-опосередкована трансформація даної культури досі пов'язана з певними складностями, зокрема, із низькою ефективністю трансформації (до 10%). Ефективність трансформації томатів залежить від численних факторів, таких як генотип обраних сортів томатів, тип штамів *A. tumefaciens*, тип промоторів та наявність сигнальних послідовностей, які регулюють експресію цільового гена, тип експлантів та концентрації фітогормонів у живильних середовищах, які використовують для селекції трансгенних рослин. Отже, перед проведенням генетичної трансформації обраних сортів томатів, спочатку визначали ефективність регенерації рослин з різних експлантів томатів на живильних середовищах, доповнених різними комбінаціями ауксинів та цитокінінів. Було виявлено, що частота регенерації з сім'ядольних листків томатів сортів Money Maker та Лагідний становить 73% та 40% на середовищі, доповненому 1 мг/л зеатину та 1 мг/л індоліл-оцтової кислоти – ці значення регенерації були найвищими у порівнянні із іншими досліджуваними комбінаціями фітогормонів. За цих умов на експлантах сорту Перлина відбувалось лише формування калюсу, регенерації пагонів не спостерігали. У подальших дослідженнях із *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації томатів, використовували саме таку комбінацію фітогормонів у складі середовища, на якому здійснювали селекцію трансгенних ліній томатів.

Трансформацію обраних сортів томатів та картоплі проводили за використання супервірулентного штаму *A. tumefaciens* ЕНА105, який містив плазмідну конструкцію pBin35LF. У даній конструкції ген лактоферину людини знаходився під контролем конститутивного 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV35S) та термінатора нопалінсинтази (Tnos).

Також, конструкція містила ген неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*), що забезпечує стійкість до канаміцину.

У результаті селекції через 3 місяці після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації було відібрано 35 ліній томатів сорту Money Maker та 27 – сорту Лагідний, стійких до 100 мг/л канаміцину, який додавали до селективного середовища МСТ-С. Також, було відібрано 44 лінії картоплі сорту Вернісаж, 26 лінії сорту Левада, 25 лінії сорту Світанок Київський та 16 лінії сорту Зарево, стійких до 100 мг/л канаміцину.

У результаті ПЛР-аналізу відібраних ліній томатів та картоплі із праймерами, специфічними до гена *hLf*, було підтверджено перенесення та інтеграцію цільового гена *hLf* в лініях досліджуваних сортів томатів та картоплі. Частоти трансформації за результатами селекції зазначених сортів рослин становили 8.1 та 2.5 % для томатів сортів Money Maker та Лагідний, а для картоплі сортів Вернісаж, Левада, Світанок Київський та Зарево – 24,2, 30,2, 24,5 та 18,5%, відповідно. Ефективність трансформації за результатами ПЛР-аналізу становила 2.8 та 3.7 % для томатів сортів Money Maker та Лагідний, для картоплі сортів Вернісаж, Левада, Світанок Київський та Зарево – 6,8, 3,8, 4 та 6,25%, відповідно. Такі показники частоти та ефективності трансформації співпадають з даними, отриманими в інших дослідженнях з генетичної трансформації томатів та картоплі. Трансгенні лінії, в геномах яких було підтверджено інтеграцію гена *hLf*, було мікроклонально розмножено на живильних середовищах МСТ та МСК без антибіотиків для їх подальшого Вестерн блот аналізу, проведення біотестів на стійкість до фітопатогенів та адаптації *in vivo*.

Для підтвердження експресії гена *hLf* в геномах трансгенних ліній, було проведено Вестерн блот аналіз тотального білка, ізольованого з трансгенних рослин, із використанням специфічних моноклональних антитіл до білка лактоферину. У результаті Вестерн блот аналізу було ідентифіковано лактоферин у зразках трансгенних ліній томатів сортів Money Maker та

Лагідний, а також у всіх досліджуваних сортах картоплі. За допомогою денситометричного аналізу було визначено концентрацію рекомбінантного лактоферину у зразках та вміст лактоферину у трансгенних рослинах. Так, для томату сорту Лагідний вміст лактоферину становив 0,04% від тотального розчинного білка (8,3 мкг/г рослинних тканин), для томату сорту Money Maker – 0,02% (4,2 мкг/г рослинних тканин), та для картоплі сорту Зарево та інших досліджуваних сортів - на рівні 0,04-0,05% від тотального розчинного білка. Такі значення вмісту рекомбінантного лактоферину є дещо вищими, ніж, наприклад, в трансгенних рослинах люцерни та картоплі, що експресують ген лактоферину людини, отриманих в інших дослідженнях. Трансгенні рослини, в яких нами було підтверджено експресію лактоферину, було успішно адаптовано *in vivo* в умовах теплиці. Також було отримано насіння F1 трансгенних ліній томатів.

Стійкість до бактеріальних та грибних фітопатогенів трансгенних ліній томатів та картоплі, що експресують лактоферин, проводили за використання бактерій *Ralstonia solanacearum* (збудник бактеріального в'янення томатів та бурої гнилі картоплі, карантинний мікроорганізм в Україні) (штам ATCC 11696), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (викликає бактеріальний рак томатів) (штам Ac-1996), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (збудник кільцевої гнилі картоплі) (штам Ac-1995), а також грибів *Phytophthora infestans* (ізолят високовірулентної раси 1.2.3.4.5.6.6+0.7.8.9.10.11 хуз) та *Fusarium sambucinum* штаму F-52211, які спричиняють фітофтороз томатів та картоплі та суху фузаріозну гниль картоплі, відповідно. Зазначені фітопатогенні мікроорганізми є надзвичайно шкодочинними на території України – за даними нещодавніх досліджень, вони викликають масштабні ураження томатів та картоплі. Штами бактерій та гриба *F. sambucinum* було отримано із колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології Національної академії наук України, ізолят *P. infestans* було люб'язно надано Інститутом картоплярства Національної академії аграрних наук України.

Стійкість до бактеріальних фітопатогенів досліджували за використання тесту “дифузії в агар”. Для проведення даного тесту на диски фільтрувального паперу наносили зразки, ізольовані із листя та пагонів трансгенних та нетрансгенних рослин (негативний контроль), а також, різні концентрації комерційного лактоферину як позитивного контролю. У результаті тестування було виявлено, що радіус зон затримки росту бактеріальних патогенів для зразків трансгенних ліній відповідає радіусу зон затримки росту для розчинів комерційного лактоферину у концентраціях, аналогічних до концентрації лактоферину у зразках із трансгенних рослин. Для зразків, отриманих з нетрансгенних ліній не спостерігали зон затримки росту бактеріальних патогенів. Отже, було виявлено антибактеріальний ефект зразків, отриманих із трансгенних ліній томатів та картоплі, на небезпечні для цих рослин бактеріальні патогени, що пов’язано, ймовірно, з експресією лактоферину.

Стійкість до грибних патогенів трансгенних ліній томатів та картоплі оцінювали шляхом зараження *in vitro* цілих рослин та відокремлених листків, а також за використання методу “дифузії в агар”. Зараження здійснювали згідно методики, розробленої Інститутом картоплярства НААН України, із незначними модифікаціями. Було виявлено підвищення стійкості всіх трансгенних ліній томатів та картоплі з 1 до 7 балів у порівнянні із нетрансгенними рослинами до *P. infestans*, та підвищення стійкості трансгенних ліній картоплі до *F. sambucinum* з 2 до 7 балів. Результати зараження відокремлених листків трансгенних та нетрансгенних ліній томатів також показали підвищену стійкість трансгенних ліній до фітофторозу. Крім того, було показано інгібування росту міцелію та утворення конідій *P. infestans* навколо лунок із зразками, отриманими із трансгенних ліній томатів, *P. infestans* та *F. sambucinum* - навколо лунок зі зразками, ізольованими із трансгенних ліній картоплі.

Отже, в даній роботі було вперше проведено *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію геном *hLf* та отримано трансгенні лінії цінних

сортів томатів (Money Maker та Лагідний) та картоплі (Вернісаж, Левада, Світанок Київський та Зарево), що експресують лактоферин людини. Також було встановлено, що трансгенні лінії томатів та картоплі, що експресують ген *hLf*, стійкі до патогенів не тільки бактеріальної (*C. michiganensis* та *R. solanacearum*), але й грибної (*P. infestans*, *F. sambucinum*) природи. Результати даної роботи вказують на перспективність використання генетичної трансформації цінних сортів рослин геном лактоферину людини для підвищення їх стійкості до широкого спектру небезпечних фітопатогенних мікроорганізмів.

Ключові слова: *Lycopersicon esculentum*, *Solanum tuberosum*, ген лактоферину людини, *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, полімеразна ланцюгова реакція, Вестерн блот аналіз, стійкість до фітопатогенів, *Clavibacter michiganensis*, *Ralstonia solanacearum*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium sambucinum*

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Статті

1. **Buziashvili AY**, Cherednichenko LM, Kropyvko SV, Blume YB, Yemets AI. Transgenic tomato lines expressing human lactoferrin show increased resistance to bacterial and fungal pathogens. *Biocatal. Agricult. Biotechnol.* 2020;25. (Q2). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101602>. (Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, аналіз експериментальних даних, написання статті).
2. **Buziashvili AY**, Cherednichenko LM, Kropyvko SV, Blume YB, Yemets AI. Obtaining transgenic potato plants expressing the human lactoferrin gene and analysis of their resistance to phytopathogens. *Cytol. Genet.* 2020;54(3):179–188. (Q4). <https://doi.org/10.3103/S0095452720030020>. (Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, аналіз експериментальних даних, написання статті).

3. **Бузіашвілі АЮ, Ємець АІ.** *Agrobacterium*-опосередкована трансформація українських сортів картоплі та томату геном лактоферину людини. *Доповіді НАН України.* 2018;10:88-94. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.10.088>. (Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, аналіз експериментальних даних, написання статті).
4. **Бузіашвілі АЮ, Чередниченко ЛМ, Кропивко СВ, Ємець АІ.** Лінії томатів, які експресують ген лактоферину людини, характеризуються стійкістю до фітофторозу. *Доповіді НАН України.* 2020;5:95–102. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.05.095>. (Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, аналіз експериментальних даних, написання статті).
5. **Бузіашвілі АЮ, Ємець АІ.** Аналіз впливу різних комбінацій регуляторів росту на регенерацію пагонів цінних сортів *Lycopersicon esculentum* Mill. в умовах *in vitro*. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2016;19:88–91. (Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, аналіз експериментальних даних, написання статті).

Тези

6. **Buziashvili AY, Yemets AI.** *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato with human lactoferrin gene. Abstracts of the I International Conference for Young Scientists, September 21-25, Kyiv. 2015, p. 111.
7. **Buziashvili AY, Yemets AI.** Determination of the most favourable nutrient medium composition for *in vitro* cultivation and direct plantlet regeneration of tomato variety Perlyna. Abstracts of the XV International Conference of Students and Young Scientists “Shevchenkivska vesna: Bioscience Advances”, April 18-21 Kyiv. 2017, p. 9.

8. **Бузіашвілі АЮ, Ємець АІ.** *Agrobacterium*-опосередкована трансформація томата сорту Лагідний для підвищення його стійкості проти фітопатогенів. Збірник тез доповідей III Міжнародної наукової конференції молодих учених “Біологія рослин та біотехнологія”, 16-18 травня Київ. 2017, с. 63
9. **Buziashvili AY, Yemets AI.** Establishment *in vitro* culture and plantlet regeneration of tomato cultivar Perlyna. Abstracts of the International Conference of Young Scientists “Modern problems of Microbiology and Biotechnology”, June 20-24 Odesa. 2017, p. 11-17.
10. **Buziashvili AY, Yemets AI.** Obtaining of phytopathogen-resistant tomato and potato plants with human lactoferrin gene. Abstracts of the 4th International Symposium on Euroasian Biodiversity. July 3-6 Kyiv. 2018, p. 12
11. **Бузіашвілі АЮ, Ємець АІ.** Антибактеріальна активність екстракту трансгенних рослин томату, що експресують ген лактоферину людини. Збірник тез доповідей V Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих вчених “Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології”, 7-8 листопада Вінниця. 2018, с. 73.
12. Yemets AI, **Buziashvili AY.** Lactoferrin expression as a tool for the enhancement of non-specific plant pathogen resistance. Abstracts of the VI Ukrainian Congress for Cell Biology with International Representation, June 18-21 Yaremche. 2019, p. 124.
13. **Buziashvili AY, Cherednichenko LM, Kropyvko SV, Yemets AI.** Transgenic expression of human lactoferrin in potato plants enhance their resistance to fungal pathogens. Abstracts of the XVIII International Conference of Students and Young Scientists “Shevchenkivska vesna: Bioscience Advances”, May 2 Kyiv. 2020, p. 7-11
14. **Buziashvili AY, Cherednichenko LM, Kropyvko SV, Yemets AI.** Expression of human lactoferrin in transgenic tomato lines enhance their resistance to bacterial and fungal phytopathogens. Abstracts of the XIV All-Ukrainian Conference of Young Scientists IMBG, 27-28 May Kyiv. 2020, p. 4.

15. **Бузіашвілі АЮ, Ємець АІ.** Експресія лактоферину людини в трансгенних рослинах томатів та картоплі підвищує їх стійкість до фітопатогенів. Збірник тез доповідей V міжнародної наукової конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, 1-2 жовтня Дніпро. 2020, с. 63

SUMMARY

Buziashvili A. Yu. Obtaining of genetically modified plants of Solanaceae family with human lactoferrin gene to enhance their resistance to phytopathogens. – Manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences on a specialty 03.00.20 – Biotechnology. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2020.

Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and potato (*Solanum tuberosum*) are among the most important vegetable crops consumed all over the world, and, in particular, in Ukraine. The growing of these cultures in the fields and greenhouses is connected with the risk of infection with bacterial and fungal pathogens which can affect up to 30-80% of the yield. Therefore, the problem of creation of the new tomato and potato cultivars resistant to a wide range of bacterial and fungal pathogens is of great importance. This could be achieved by the means of genetic transformation of the cultivars sensitive to phytopathogens with the human lactoferrin gene (*hLf*). Lactoferrin is a protein of the transferrin family which is present in the milk, saliva, tears and other secretory fluids of mammals. Besides the ability to bind and transfer the Fe^{2+} and Fe^{3+} ions, this protein possesses the antibacterial, antiviral, fungistatic, antiprotozoal, nematostatic, and other activities. Therefore, the transfer of human lactoferrin gene in the genome of commercially valuable plant cultivars could enhance their resistance to wide range of phytopathogens. The aim of this study was to carry out the *Agrobacterium*-mediated transformation with the human lactoferrin gene of the three tomato cultivars (Money Maker, Lahidny and Perlyna) and 4 potato cultivars of Ukrainian selection (Vernisage, Levada, Svitanok Kyivskyi and Zarevo) which all are sensitive to bacterial and fungal pathogens.

Although more than 30 years have passed since the first genetically modified tomato plants were obtained, *Agrobacterium*-mediated transformation of this culture

is still connected with some complications such as low transformation efficiency (below 10%). The efficiency of tomato transformation depends on the numerous factors such as the genotype of the chosen cultivars, type of the *A. tumefaciens* strains, type of the promoters and presence of the signal sequences which regulate the expression of the target gene, the type of explants and concentration of the phytohormones in the nutrient medium used for the selection of the transformed plants. Before the transformation of the chosen tomato cultivars, the efficiency of regeneration of the different explants was determined on the nutrient medium supplemented with the different combinations of auxins and cytokinins. It was found that the highest frequency of direct regeneration of the internodes of the tomato cultivar Perlyna is 100% on the MS medium without any phytohormones, and the regeneration on hypocotyls and cotyledons was not found. The frequency of regeneration of the cotyledons of tomato cultivars Money Maker and Lahidny on the medium supplemented with 1 mg/l of zeatin and 1 mg/l of indolile-acetic acid were 73 and 40% – these values were the highest comparing with the other investigated combinations of phytohormones. In the further investigations on the *Agrobacterium*-mediated tomato transformation, the selective medium supplemented with the ascribed concentration of phytohormones was used.

Transformation of tomato and potato cultivars was carried out with the use of supervirulent *A. tumefaciens* strain EHA105, which contained pBin35LF plasmid vector. In this plasmid the human lactoferrin gene was placed under constitutive 35S promoter of cauliflower mosaic virus (CaMV35S) and nopaline synthase terminator (Tnos). Also, the plasmid contained neomycine phosphotransferase II gene (*nptII*) conferring resistance to kanamycin.

As a result of *Agrobacterium*-mediated transformation, after 3 months of selection 35 lines of tomato cultivar Money Maker and 27 lines of cv. Lahidny resistant to 100 mg/l of kanamycin on the selective MST-S medium were obtained. Also, 44 lines of potato cultivar Vernisage, 26 lines of cv. Levada, 25 lines of cv. Svitanok Kyivskyi and 16 lines of cv. Zarevo resistant to 100 mg/l of kanamycin on

the selective media MSK-S1 and MSK-S2 were obtained. Transformation frequencies according to the results of the selection were 8.1 and 2.5 % for tomato cultivars Money Maker and Lahidny; transformation frequencies for potato cultivars Vernisage, Levada, Svitanok Kyivskiyi and Zarevo were 24,2, 30,2, 24,5 and 18,5%, respectively.

Integration of the target gene in the genomes of selected lines was confirmed with the use of PCR analysis with the primers specific to *hLf* gene. The *hLf* gene was detected in the 1 line of each cultivar of tomato and potato used in this study. Transformation efficiency according to the results of PCR analysis was 2.8 and 3.7 % for tomato cultivars Money Maker and Lahidny, and 6,8, 3,8, 4 and 6,25%, for potato cultivars Vernisage, Levada, Svitanok Kyivskiyi and Zarevo, respectively. These values of transformation efficiency were comparable to the results of other studies on genetic transformation of tomato and potato. Transgenic tomato and potato lines with confirmed integration of *hLf* gene in their genomes were micropropagated on MST and MSK media without antibiotics for further Western blot analysis, biotests on the resistance to phytopathogens and adaptation *in vivo*.

To confirm the expression of *hLf* gene in the genomes of transgenic lines, the Western blot hybridization of the total protein extracts from transgenic plants with the monoclonal antibodies against lactoferrin was carried out. As a result of Western blot analysis, lactoferrin protein was detected in the samples which contained the total protein of transgenic lines of tomato cultivars Money Maker and Lahidny, and potato cultivar Zarevo. The concentration of recombinant lactoferrin in the samples and its content in transgenic tomato lines was estimated with the use of densitometric analysis. For tomato cv. Lahidny, the lactoferrin content was 0,04% of total soluble protein (8,3 $\mu\text{g/g}$ of plant tissues), for tomato cv. Money Maker – 0,02% (4,2 $\mu\text{g/g}$ of plant tissues), for potato cv. Zarevo and other studied cultivars at the level 0,04-0,05% of total soluble protein. These values of the content of recombinant lactoferrin are higher than in transgenic alfalfa plants and on the similar level with the transgenic potato plants carrying the *hLf* gene which were obtained in other studies. Transgenic

plants with confirmed lactoferrin expression were successfully adapted *in vivo* in the greenhouse. The seeds of F1 transgenic tomato lines were also obtained.

The resistance of transgenic tomato and potato lines expressing lactoferrin was investigated to bacterial pathogens such as *Ralstonia solanacearum* ATCC 11696 (causal of bacterial wilt of tomatoes and brown rot of potato, quarantine phytopathogen in Ukraine), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Ac-1996 (causing bacterial cancer of tomatoes), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* Ac-1995 (causing potato ring rot), and to fungi *Phytophthora infestans* (isolate of the highly virulent race 1.2.3.4.5.6.6+0.7.8.9.10.11 xyz) and *Fusarium sambucinum* F-52211, which are the causatives of the late blight of tomatoes and potatoes and potato dry rot. These phytopathogenic microorganisms are extremely harmful in Ukraine – according to the data of the recent studies, they can cause large-scale damage to tomato and potato crop. The bacterial strains and strain of *F. sambucinum* were obtained from the collection of microorganisms of the Institute of microbiology and virology of the National Academy of Sciences of Ukraine, the isolate of *P. infestans* was kindly provided by the Institute of Potato of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine.

The resistance to bacterial phytopathogens was investigated with the use of the disk diffusion assay. For this assay, the sterile whatman disks were loaded with the samples isolated from leaves and stems of transgenic and non-transgenic (control) lines, as well as the solutions of commercial lactoferrin as positive control. As a result of this test, the radiuses of growth inhibition zones of bacterial pathogens around the disks loaded with the samples from transgenic lines were comparable with the size of growth inhibition zones around the disks loaded with the solutions of commercial lactoferrin at concentrations similar to that in the samples from transgenic lines. The growth inhibition zones on bacterial pathogens were not observed for the samples from non-transgenic lines. Therefore, the bactericidal effect of the іФЪЗДУі from transgenic lines of tomatoes and potato was shown on highly virulent and aggressive bacterial pathogens as the result of the lactoferrin expression.

Investigation of fungistatic effect of the samples of transgenic plants on *P. infestans* was carried out with the use of agar diffusion assay. For this, the wells in the nutrient medium were loaded with the samples isolated from transgenic and non-transgenic plants, and the disks of nutrient medium with mycelia of *P. infestans* and *F. sambucinum* were placed in the center of Petri dishes. As the results of this test, inhibition of the mycelium growth and conidia formation was observed around the wells loaded with sampled of transgenic plants. The fungistatic effects were not observed around the wells with the samples of non-transgenic tomato and potato lines.

The resistance to fungal pathogens of transgenic lines of tomato and potato cultivars was analyzed *in vitro* with the use of infection of the whole plants and detached leaves. Biotests were carried out according to the original assay developed by the Institute of potato NAAS of Ukraine with minor modifications. The resistance of the infected plants to *P. infestans* and *F. sambucinum* was estimated in 8 days after inoculation by 9-point score pointing out such symptoms as the appearance of brown necrotic lesions on leaves, wilting and the appearance of mycelium. The enhancement of the resistance to *P. infestans* of transgenic tomato and potato lines from 1 to 7 points was pointed out comparing to non-transgenic, and from 2 to 7 points – of potato lines to *F. sambucinum*. The results of the infection of the detached leaves of transgenic and non-transgenic tomato lines also showed the enhanced resistance of transgenic plants to late blight.

To sum up, in this research the enhancement of the resistance of transgenic lines of the valuable tomato (Money Maker and Lahidny) and potato (Zarevo) cultivars was shown for the first time not only to bacterial (*C. michiganensis* and *R. solanacearum*) but also to fungal (*P. infestans*, *F. sambucinum*) phytopathogens. Results of this work show the promising opportunities of the use of human lactoferrin gene for genetic transformation of the valuable crop plants to enhance their resistance to wide range of highly infective phytopathogenic microorganisms.

Key words: *Lycopersicon esculentum*, *Solanum tuberosum*, human lactoferrin gene, *Agrobacterium*-mediated transformation, polymerase chain reaction, Western blot analysis, resistance to phytopathogens, *Clavibacter michiganensis*, *Ralstonia solanacearum*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium sambucinum*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	20
ВСТУП.....	22
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	30
1.1. Біотехнологічні підходи для покращення агрономічних характеристик картоплі.....	30
1.1.1. Сучасні біотехнологічні підходи до покращення сортів картоплі.....	31
1.1.2. Характеристика різних методів генетичної трансформації картоплі.....	32
1.2. Біотехнологічні підходи щодо покращення характеристик томату.....	40
1.2.1. Особливості культивування <i>in vitro</i> рослин томатів.....	42
1.2.2. Особливості генетичної трансформації <i>L. esculentum</i>	44
1.3. Найбільш розповсюджені хвороби томатів та картоплі.....	49
1.4. Характеристики основних збудників бактеріальних хвороб томатів та картоплі.....	50
1.5. Характеристики грибних патогенів томатів та картоплі.....	53
1.6. Контроль над хворобами та стратегії щодо створення стійких до них рослин.....	58
1.7. Структура та антимікробна активність лактоферину.....	65
1.8. Трансгенні рослини, що експресують гени лактоферину.....	70
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	76
2.1. Рослинний матеріал, культури бактерій та грибів, використані в роботі.....	76
2.2. Характеристика реактивів, використаних в роботі.....	78
2.3. Особливості культивування <i>in vitro</i> рослинних об'єктів.....	79
2.3.1. Дослідження впливу різних факторів на регенерацію <i>L. esculentum</i> в умовах <i>in vitro</i>	80
2.4. Культивування різних видів бактерій та грибів, використаних в дослідженні.....	82

2.5. <i>Agrobacterium</i> -опосередкована трансформація рослин картоплі та томату.....	83
2.5.1. Штам <i>A. tumefaciens</i> та плазмідна конструкція для трансформації картоплі та томатів.....	83
2.5.2. Методика <i>Agrobacterium</i> -опосередкованої трансформації картоплі.....	84
2.5.3. Методика <i>Agrobacterium</i> -опосередкованої трансформації томатів.....	86
2.6. Ізолювання плазмідної ДНК.....	87
2.7. Ізолювання геномної ДНК з рослин за допомогою цетилтриметил амоній броміду (метод ЦТАБ).....	87
2.8. ПЛР-аналіз трансгенних ліній томатів та картоплі.....	89
2.9. Вестерн блот аналіз трансгенних ліній томатів та картоплі.....	89
2.10. Біотести на стійкість до фітопатогенів трансгенних ліній.....	91
2.10.1. Дослідження бактерицидного та фунгістатичного впливу зразків із трансгенних рослин.....	91
2.10.2. Визначення стійкості трансгенних рослин та тканин до фітофторозу та фузаріозу методом зараження <i>in vitro</i>	92
2.11. Статистична обробка отриманих даних.....	94
РОЗДІЛ 3. ОТРИМАННЯ ТА АНАЛІЗ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН <i>S. tuberosum</i> З ГЕНОМ <i>hLf</i>.....	
3.1. Перенесення гена <i>hLf</i> , отримання трансгенних ліній картоплі та їх ПЛР-аналіз.....	95
3.2. Вестерн блот аналіз трансгенних ліній картоплі.....	99
3.3. Біотести на стійкість трансгенних ліній картоплі до фітопатогенів.....	101
3.3.1. Дослідження антибактеріального впливу зразків із трансгенних ліній картоплі.....	101
3.3.2. Дослідження фунгістатичного впливу зразків із трансгенних ліній картоплі.....	103

3.3.3. Аналіз стійкості до фітофторозу та фузаріозу трансгенних ліній картоплі в умовах <i>in vitro</i>	104
РОЗДІЛ 4. ОТРИМАННЯ ТА АНАЛІЗ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН <i>L. esculentum</i> З ГЕНОМ <i>hLf</i>	108
4.1. Введення в культуру <i>in vitro</i> та аналіз регенераційного потенціалу різних експлантів томатів сортів Перлина, Лагідний та Money Maker.....	108
4.2. <i>Agrobacterium</i> -опосередкована трансформація томатів, селекція та ПЛР-аналіз трансгенних ліній.....	115
4.3. Аналіз трансгенних ліній томатів за допомогою Вестерн блоттингу.....	121
4.4. Аналіз трансгенних ліній томатів за допомогою біотестів.....	122
4.4.1. Дослідження антибактеріального та фунгістатичного впливу зразків із трансгенних ліній томатів.....	122
4.4.2. Аналіз стійкості до фітофторозу трансгенних ліній томатів.....	126
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	131
ВИСНОВКИ.....	138
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	140
ДОДАТОК.....	168

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

2,4-Д – 2,4-дихлорофеноксоцтова кислота

bLf – ген бичачого лактоферину

CaMV – вірус мозаїки цвітної капусти

CRISPR - clustered regularly interspaced short palindromic repeats

ECL – посилена хемілюмінесценція

gus – ген β-глюкуронідази

hLf – ген лактоферину людини

HR – реакція гіперчутливості

Lfamrin – лактоферампін

Lfcin – лактоферицин

nos – нопаліновий термінатор

nptII – ген неоміцинфосфотрансферази II

PG – ген полігалактуронази

PR білки – pathogenesis-related proteins

QTL – локус кількісних ознак

ROS – активні форми кисню

TYLCV – вірус пожовтіння та згортання листя томатів

АМП – антимікробний пептид

БАП – 6-бензиламінопурин

ГК – гіберелова кислота

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

дНТФ – дезоксинуклеотидтрифосфати

ДСН – додецилсульфат натрію

ІОК – індоліл-оцтова кислота

КДА – картопляно-декстрозний агар

КУО – колонієутворюючі одиниці

МС – солі за Мурасіге і Скугом (Murashige & Skoog, 1962)

НОК – нафтилоцтова кислота

п.о. – пар основ

ПЕГ – поліетиленгліколь

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ТРБ – тотальний розчинний білок

ЦТАБ – цетилтриметил амоній бромід

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Протягом останніх років в усьому світі, і в Україні, зокрема, спостерігають загальносвітові тенденції змін клімату – підвищення середньорічної температури та зменшення кількості опадів, що сприяє інтенсивному розвитку в міжвегетаційний період шкідників та фітопатогенних мікроорганізмів (McDonald & Stukenbrock, 2016). Неконтрольоване використання хімікатів для обробки рослин з метою запобігання їх зараження хворобами та недотримання умов зберігання врожаю також сприяють зміні генетичної структури популяції фітопатогенів та збільшенню їх агресивності (Чередниченко, 2012).

В Україні протягом останнього десятиліття найбільш розповсюдженими та шкодочинними грибними хворобами, що заражають томати (*Lycopersicon esculentum* Mill. або *Solanum lycopersicum* L.) та картоплю (*Solanum lycopersicum* L.), є фітофтороз та фузаріоз, збудниками яких є *Phytophthora infestans* та *Fusarium spp.* (Elansky et al., 2015; Федорчук, 2017; Шотик та ін., 2014; Сергієнко, 2012; Тимошук, 2013; Тарасенко та Чечітко, 2006). Серед збудників бактеріальних хвороб томатів, найбільш розповсюдженими на території України є *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas vesicatoria* та *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Kolomiec & Avetisyan, 2014; Kolomiiets et al., 2017a, 2017b, 2019a, 2019b; Коломієць та ін., 2014, 2016, 2017; Аветисян та ін., 2014). Картоплю найчастіше заражають бактеріальні патогени *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Pectobacterium* sp., *Dickeya* sp (Бородай та Парфенюк, 2018). Також, надзвичайно важливим патогеном, що заражає більшість представників родини Пасльонових та завдає значних економічних збитків, є *Ralstonia solanacearum*. В Україні, даний патоген є карантинним мікроорганізмом (Грицай та Варбанець, 2012).

Враховуючи вищезазначене, надзвичайно актуальною проблемою є створення нових сортів томатів та картоплі, стійких до широкого спектру фітопатогенів. Так, в роботі (Шотик та ін., 2014) протягом 2010-2014 років було

досліджено стійкість до фітопатогенів більш ніж 10 тис. сортів томатів, і в результаті виявлено, що понад 75,4% сортів були високочутливими до грибних хвороб. Крім того, більшість виробників картоплі в Україні використовує для садіння несертифікований матеріал багаторічних репродукцій, значною мірою уражений вірусами, бактеріями і грибами (Чередниченко, 2012, 2013). Отже, отримання нових сортів томатів та картоплі, зокрема і вітчизняних, стійких до захворювань, що викликають дані патогени, є важливим завданням на сьогоднішній день.

Використання методів генної інженерії рослин як альтернативного підходу до традиційної селекції та застосування пестицидів може забезпечити комплексну довготривалу стійкість до бактеріальних, грибних та вірусних фітопатогенів. Раніше було встановлено, що перенесення генів, які забезпечують стійкість до фітопатогенів, зокрема, гена лактоферину людини, до рослинного генома може бути одним з перспективних методів захисту рослин від хвороб (Bruce, 2012; Ceasar & Ignacimuthu, 2012; Grant et al., 2013; Rommens & Kishore, 2000; Strange & Scott, 2005; Yemets et al., 2014). Лактоферин – це Fe^{3+} -зв'язуючий білок із родини трансферинів, який міститься у великій кількості у молоці та секреторних рідинах ссавців. Лактоферин є компонентом неспецифічного природного імунітету людини, оскільки проявляє протизапальну, протиракову, противірусну, бактерицидну, фунгістатичну та ін. активності (Stefanova et al., 2008; Yemets et al., 2014; Lakshman et al., 2013). Слід зазначити, що рослинні трансфериноподібні білки (TF-like proteins) на сьогоднішній день були виявлені лише у деяких видів *Chlorophyta* (*Chlorella variabilis*), *Pteridophyta* (*Selaginella moellendorffii*) та *Angiospermae* (*Glycine max*, *Theobroma cacao*, *Medicago truncatula* та *Citrus clementina*) (Lina et al., 2016).

У попередніх дослідженнях було показано антибактеріальні властивості рекомбінантного лактоферину чи його фрагментів, отриманого у результаті експресії в трансгенних рослинах тютюну (Mitra & Zhang, 1994; Zhang et al., 1998; Fukuta et al., 2012; Chahardoli et al., 2018), люцерни (Stefanova et al., 2013), груші (Malnoy et al., 2003), томату (Lee et al., 2002), рису (Takase et al., 2005), а

також фунгіцидну активність у результаті експресії в трансгенних рослинах тютюну (Fukuta et al., 2012; Nguyen et al., 2011), рису (Takase et al., 2005), пшениці (Han et al., 2012), арабідопсису (Nguyen et al., 2011), тощо.

Отже, отримання рослин томатів (*Lycopersicon esculentum*) та картоплі (*Solanum tuberosum*) з геном лактоферину людини є актуальним завданням, оскільки його експресія може підвищити стійкість трансгенних ліній даних рослин до найбільш поширених та небезпечних фітопатогенів бактеріальної та грибної природи, зокрема, *Phytophthora infestans*, збудника фітофторозу томатів та картоплі, *Fusarium sambucinum*, збудника сухої гнилі картоплі, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, що спричиняє бактеріальний рак томатів, *S. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, що є збудником кільцевої гнилі картоплі, та *Ralstonia solanacearum*, що спричиняє бактеріальне в'янення томатів та буру гниль картоплі. Саме на вирішення цього питання і була спрямована дана робота.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота була виконана за фінансової підтримки проекту “Застосування гена лактоферину для створення стійких до фітопатогенів ліній рослин родини Solanaceae” цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України “Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства” (2015-2019 рр.) (номер державної реєстрації – 0115U005021).

Мета і задачі дослідження. Метою роботи було отримання генетично модифікованих ліній рослин родини Solanaceae, зокрема, картоплі та томатів, з геном лактоферину людини (*hLf*), підтвердження інтеграції цього гена в геном досліджуваних рослин та його експресії за допомогою молекулярно-генетичних та біохімічних методів, оцінка морфологічних показників трансгенних рослин та їх стійкості до збудників бактеріальних та грибних хвороб.

У відповідності до поставленої мети, до завдань експериментальної роботи входило:

1) Введення в культуру *in vitro* рослин томату сортів Money Maker, Лагідний і Перлина, а також аналіз впливу різних комбінацій фітогормонів у складі живильних середовищ на морфогенетичний потенціал їх експлантів.

2) *Agrobacterium*-опосередкована трансформація картоплі сортів Вернісаж, Світанок Київський, Левада та Зарево, томатів сортів Money Maker та Лагідний геном *hLf* та селекція трансгенних ліній рослин.

3) Молекулярно-генетичний аналіз трансгенних ліній картоплі сортів Вернісаж, Світанок Київський, Левада та Зарево та томатів сортів Money Maker та Лагідний для підтвердження інтеграції гена *hLf* в геноми досліджуваних рослин.

4) Біохімічний аналіз трансгенних ліній томатів та картоплі для підтвердження експресії лактоферину в цих рослинах і визначення вмісту цього білка в трансгенних рослинах томатів та картоплі.

5) Дослідження антибактеріальної та фунгіцидної активності зразків трансгенних ліній картоплі та томатів, що експресують лактоферин, до бактеріальних (*C. michiganensis*, *R. solanacearum*) та грибних (*P. infestans*, *F. sambucinum*) фітопатогенів за допомогою біотестів.

6) Аналіз стійкості трансгенних рослин картоплі та томатів до зараження *P. infestans* та *F. sambucinum* в умовах *in vitro*.

Об'єкт дослідження. Генетично модифіковані рослини картоплі та томату та їх стійкість до фітопатогенів.

Предмет дослідження. Перенесення гена лактоферину людини (*hLf*) в рослини томату (*L. esculentum*) та картоплі (*S. tuberosum*) для підвищення їх стійкості до фітопатогенів бактеріального та грибного походження.

Методи дослідження. Методи культури тканин і органів рослин *in vitro*, генетична трансформація за допомогою *A. tumefaciens*, молекулярно-генетичний аналіз (полімеразна ланцюгова реакція), біохімічний аналіз (Вестерн блот гібридизація), методи культури бактеріальних клітин та міцелію грибів *in vitro*, метод дифузії в агар, метод зараження *in vitro* інтактних

стерильних рослин та тканин конідіями *Phytophthora infestans* та *Fusarium sambucinum*, методи статистичного аналізу.

Наукова новизна отриманих результатів. Розроблено методику введення в культуру *in vitro* сортів томату Лагідний та Перлина та досліджено їх морфогенетичний потенціал. За допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації отримано генетично модифіковані лінії томатів сортів Money Maker та Лагідний та картоплі сортів Вернісаж, Світанок Київський, Зарево та Левада, що експресують ген лактоферину людини. Вперше продемонстровано антибактеріальний ефект зразків, отриманих із трансгенних рослин картоплі, що експресують лактоферин, на фітопатогенні бактерії *R. solanacearum* (збудник бактеріального в'янення томатів та бурої гнилі картоплі) та *S. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (збудник кільцевої гнилі картоплі). Вперше встановлено, що зразки трансгенних ліній томатів з геном *hLf* проявляють антибактеріальну дію до *S. michiganensis* subsp. *michiganensis* (збудник бактеріального раку томатів). Вперше показано фунгістатичний ефект зразків трансгенних ліній картоплі та томатів, що експресують лактоферин, на *P. infestans*, а також зразків трансгенних ліній картоплі на *F. sambucinum*, який є збудником сухої гнилі бульб картоплі. Також, в умовах зараження *in vitro* рослин та тканин вперше показано підвищення стійкості трансгенних ліній картоплі та томатів, що експресують *hLf*, до *P. infestans*, та трансгенних ліній картоплі до *F. sambucinum*.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані в даній роботі трансгенні рослини томату та картоплі, що експресують ген лактоферину людини, є стійкими до небезпечних фітопатогенних бактерій (*R. solanacearum*, *S. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *S. michiganensis* subsp. *sepedonicus*) та грибів (*P. infestans*, *F. sambucinum*) і можуть бути використані у селекційній роботі та подальших наукових дослідженнях. Результати даної роботи вказують на перспективність генетичної трансформації цінних рослинних культур геном лактоферину людини для підвищення їх стійкості до широкого спектру фітопатогенів.

Особистий внесок здобувача. Постановку наукових завдань досліджень, наступну інтерпретацію отриманих результатів та розробку структури дисертаційної роботи було здійснено спільно з науковим керівником. Основні дослідження – отримання трансгенних ліній рослин, їх молекулярно-генетичний аналіз та біотести на стійкість до фітопатогенів було проведено автором особисто. Біохімічний аналіз отриманих ліній рослин було здійснено разом із співавторами публікацій.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень було апробовано на ІХ Всеукраїнській конференції молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ, Україна, 2015 р.), ХІ Міжнародній науковій конференції “Фактори експериментальної еволюції організмів” (Одеса, Україна, 2016 р.), ХV Міжнародній науковій конференції “Шевченківська весна: досягнення біологічної науки” (Київ, Україна, 2017 р.), Третій конференції молодих учених “Біологія рослин та біотехнологія” (Київ, Україна, 2017 р.), Міжнародній конференції молодих вчених “Сучасні проблеми мікробіології та біотехнології” (Одеса, Україна, 2017 р.), ІV Міжнародному симпозіумі Євразійського біорізноманіття (Київ, Україна, 2018 р.), V Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених “Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології” (Вінниця, Україна, 2018 р.), VI з’їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Яремче, Україна, 2019 р.), ХІV Міжнародній науковій конференції “Фактори експериментальної еволюції організмів” (Київ, Україна, 2019 р.), ХVІІІ Міжнародній науковій конференції “Шевченківська весна: досягнення біологічної науки” (Київ, Україна, 2020 р.), ХІV Всеукраїнській конференції молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ, Україна, 2020 р.), V Міжнародній науковій конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології” (Дніпро, Україна, 2020 р.).

Публікації. За результатами роботи опубліковано 15 наукових праць, в тому числі 2 статті у міжнародних наукових журналах, 3 статті у вітчизняних

фахових виданнях, та 10 тез у матеріалах наукових конференцій, симпозіумів та з'їздів.

Структура і обсяг дисертації. Дисертація викладена на 170 сторінках друкованого тексту та складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, їх аналізу та обговорення, висновків, списку використаних джерел, який містить 291 посилання, додатку. Дисертаційна робота містить 25 рисунків, 2 таблиці.

Подяки. Автор висловлює щиро подяку науковому керівникові, д.б.н., проф., члену-кореспонденту НАН України Аллі Ємець за керівництво роботою, допомогу у плануванні експериментів та в інтерпретації результатів, за допомогу у підготовці публікацій та рукопису дисертації. Також, автор висловлює подяку к.б.н., с.н.с. відділу функціональної геноміки Інституту молекулярної біології та геноміки НАН України Сергію Кропивко за допомогу у проведенні Вестерн блот аналізу та к.с-г.н., с.н.с. відділу селекції Інституту картоплярства НААН України Любові Чередниченко за надання культури *P. infestans* та консультацію під час проведення біотестів. Автор щиро дякує рідним та близьким за підтримку та розуміння.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біотехнологічні підходи для покращення агрономічних характеристик картоплі

Серед овочевих культур, картопля (*Solanum tuberosum*) займає одне із провідних положень на світовому ринку, при цьому Україна входить до десятки найбільших країн-виробників картоплі (Kovaliv, 2018; Khalatur, 2017; van Leeuwen et al., 2012). Зокрема, у 2019 році урожай картоплі в Україні становив більш ніж 20 млн. т. – даний показник був вищим лише в Китаї, Індії та Росії (http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity). Картоплю вживають у неперебробленому вигляді (столові сорти) та як сировину для харчової промисловості у вигляді напівфабрикатів (картопля фри), дегідратованих продуктів (картопляна мука, картопляні пластівці) та снєків (Rudelsheim & Smets, 2012). Із картоплі також виготовляють крохмаль, глюкозу, декстрин, та ін. Картопляний крохмаль, окрім харчової промисловості, також використовують у виробництві паперу, тканин, спиртних напоїв, і т.д. Відходи переробки картоплі застосовують як корм для худоби (Rudelsheim & Smets, 2012).

Картопля характеризується високим вмістом поживних речовин, мікроелементів та біологічно активних сполук. Так, вміст крохмалю може коливатись від 13 до більш ніж 30% в залежності від сорту. Також, картопля є важливим джерелом вітамінів та мінералів, зокрема, калію, магнію, заліза. Серед вітамінів, найбільшим є вміст вітаміну С (27 мг у 100 г бульб) та вітамінів групи В (В1, В2, В6, В9). Добова норма вітаміну С для людини міститься у 300 г картоплі, що дуже важливо у зимовий період, коли в раціоні мало свіжих фруктів і овочів. Досить високою є калорійність картоплі: 100 г бульб містять 70–83 кілокалорії. Картопля містить також біологічно активні речовини – каротиноїди, фенольні кислоти, флавоноїди та глікоалкалоїди (α -

хаконін та α -соланін), які у невеликій кількості мають протизапальну, антиалергенну дію та знижують рівень холестеролу (Beals, 2019).

Картопля (*Solanum tuberosum* L.) – однорічна в культурі, багаторічна у дикомі стані трав'яниста рослина з розгалуженим пагоном висотою 30 см – 1,5 м. Листки складні – переривчасто-непарноперисторозсічені. Коренева система стрижневого типу при пророщуванні із насіння, мичкуватого – при вегетативному розмноженні, глибина проникнення в ґрунт – від 30 см до 1,5 м. У листкових пазухах підземної частини стебел розвиваються столони – бічні пагони довжиною 15-50 см, які проникають у ґрунт та на яких утворюються бульби. За періодом досягання бульб, розрізняють ранні (90-100 діб), середньоранні (101-115), середньостиглі (116-130), середньопізні (131-140 діб) і пізні (більше 140 діб) сорти картоплі. На відміну від помідорів, картопля є менш вибагливою культурою до температурного режиму, сонячного світла та рівня зволоження. Оптимальною температурою росту є 18-22°C, мінімальною - 7°C, критичною - 42°C. Натомість, картопля більш вибаглива до пухкості ґрунту, його проникності для вологи та повітря. При надмірному зволоженні бульби уражуються фітопатогенами та загнивають (Строяновський, 2016).

Розмноження картоплі здійснюють як за допомогою насіння, так і, найчастіше, вегетативним шляхом. Завдяки вегетативному розмноженню можливе збереження характеристик сорту (продуктивність, смакові якості, період досягання), але внаслідок переважання вегетативного розмноження також відбувається деградація насінневого матеріалу в результаті інфікування фітопатогенами (Chuntale, 2018), тому генетичне покращення сортів картоплі на сьогоднішній день є актуальним завданням.

1.1.1. Сучасні біотехнологічні підходи до покращення сортів картоплі.
Одним із найбільш визначних досягнень сучасної молекулярної генетики та біотехнології є розшифрування геномів різних організмів, зокрема, картоплі, та створення генетичних карт. Завдяки визначенню локусів якісних ознак (QTL), які містять гени, що відповідають за морфологічні ознаки, процес розвитку рослин та смакові якості бульб, а також гени стійкості картоплі до хвороб,

можливо проводити маркер-асоційовану селекцію, яка є значно менш часозатратною та більш точною, ніж класична селекція. Однак, навіть із застосуванням даного підходу селекція є складним процесом, оскільки більшість промислово цінних ознак є полігенними, і на їх прояв значно впливають фактори навколишнього середовища; також, селекцію ускладнює той факт, що вид *Solanum tuberosum* є тетраплоїдним ($2n=4x=48$) (Watanabe, 2015), тому важко досягти гомозиготності за певною ознакою (Mullins et al., 2006).

Окрім маркер-асоційованої селекції, для збереження якості бульб цінних сортів картоплі також використовують методи культивування *in vitro* та мікроклонального розмноження. Завдяки цим біотехнологічним підходам можливе збереження генотипів цінних сортів та отримання стерильних насінневих бульб, не заражених фітопатогенами. Однією із перших робіт, в якій описано методики введення картоплі в культуру *in vitro*, її культивування та мікроклонального розмноження, є робота Hussey and Stacey (1981). В даному дослідженні інтенсивний ріст пагонів та коренів картоплі різних сортів спостерігали на безгормональному середовищі МС (Murshige and Skoog, 1962). Як експланти використовували проростки бульб. В нещодавно опублікованих дослідженнях (Xhulaj & Gixhari, 2018; Salem & Hassanein, 2017) як експлатни також використовували проростки бульб картоплі, які також культивували на середовищі МС, але для підвищення ефективності регенерації їх культивували у присутності фітогормонів БАП та гіберелової кислоти, ГК (GA_3).

Також, методи культивування *in vitro* використовують для фундаментальних досліджень процесів росту та розвитку рослин картоплі, механізмів відповіді на стресові чинники та ін., та для генетичної трансформації цінних сортів картоплі (Mullins et al., 2006).

1.1.2. Характеристика різних методів генетичної трансформації картоплі. Загалом, генетичну трансформацію картоплі можливо здійснювати за використання різних методів. На сьогоднішній день існує широкий спектр методів генетичної трансформації рослин, але найбільш ефективним методом

трансформації картоплі є *Agrobacterium*-опосередкована трансформація. Також, існують методики трансформації картоплі за використання методів бомбардування наночастинками (Malakhova et al., 2020), трансформації протопластів шляхом електропорації (Jones et al., 1989) та обробки ПЕГ (поліетиленгліколем) (Feher et al., 1991). Зокрема, у роботі (Andersson et al., 2018) описано методику редагування геному картоплі із застосуванням технології CRISPR/Cas9. У даному дослідженні описано доставку векторної конструкції, що містить гени CRISPR/Cas9, у протопласти картоплі після їх обробки 25% ПЕГ 4000. Найчастіше здійснюють перенос ДНК в ядерний геном картоплі, але розроблено також методики трансформації пластидного геному картоплі (Occhialini et al., 2020). Трансформація протопластів ускладнена тим фактом, що гени пластидного геному організовані в систему оперонів, тобто, експресія декількох генів може відбуватись під контролем одного промотору, і інтеграція чужорідного гена в пластидний геном може порушити систему експресії певних генів пластид.

Хоча після публікації першої методики генетичної трансформації картоплі було опубліковано велику кількість різноманітних протоколів, досі існують проблеми низької ефективності трансформації деяких сортів картоплі. Важливими факторами, що впливають на ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, є генотип, тип експланту, штам агробактерії, наявність певних регуляторів росту у складі живильного середовища, та ін. Загалом, процес *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації включає наступні етапи: виділення експлантів, вирощування агробактерії, прекультивування експлантів, інокуляція, кокультивування експлантів із агробактерією, селекція трансформованих експлантів та регенерантів, вкорінення трансгенних рослин (Vinterhalter et al., 2008; Bruce & Rupp, 2019).

Найчастіше для трансформації використовують такі експланти: фрагменти стебла, листків, бульб. Оскільки ізолювання експлантів є стресовим фактором, перед інокуляцією необхідно проводити процедуру відновлення рослинних тканин. Для цього, експланти культивують 1-2 доби на середовищі

для кокультивування. До складу середовища для прекультивування та кокультивування додають подібну комбінацію фітогормонів, як і до середовища для індукції калюсогенезу та ембріогенезу (Vinterhalter et al., 2008; Bruce & Rupp, 2019). Ефективність трансформації може відрізнятись для різних сортів та різних типів експлантів. Так, у (Khatun et al., 2012) описано методику трансформації картоплі сортів Cardinal та Heera. Як експланти використовували листкові диски та міжвузля, ефективність трансформації оцінювали за результатами гістохімічного аналізу експресії гена *gus*. В результаті трансформації не було отримано трансгенних рослин сорту Heera, а ефективність трансформації листкових дисків сорту Cardinal була вищою (80%), ніж міжвузлів (60%) (Khatun et al., 2012). В іншій роботі (Molla et al., 2011) було проведено трансформацію картоплі сортів Asterix та Diamant також репортерним геном *gus*. Як експланти використовували міжвузля, ефективність трансформації була на рівні 24 та 28% для зазначених сортів (Molla et al., 2011). Більше того, автори (Han et al., 2015) повідомляють про вплив тривалості періоду культивування в умовах *in vitro* рослин, які використовують як джерело експлантів, на ефективність трансформації рослин. Зокрема, було показано, що ефективність трансформації міжвузлів та листкових дисків картоплі сорту Jowon, виділених із рослин, які культивували протягом 6 місяців та кожні 3-4 тижні пересаджували на свіже середовище, становила 16,3% та 18,4% і була нижчою, ніж ефективність трансформації експлантів рослин, пророщених із мікробульб (17,8% для міжвузлів та 25,5% для листкових дисків) (Han et al., 2015).

Найбільш широко для генетичної трансформації картоплі застосовують штам *A. tumefaciens* LVA 4404. Інокуляція – контакт експланта з культурою бактерії, який триває 1-2 хв або 10-30 хв. У деяких методиках під час інокуляції у бактеріальну суспензію рекомендують додавати ацетосирингон. Після інокуляції, експланти просушують на стерильному фільтрувальному папері, іноді попередньо промивають стерильною дистильованою водою або рідким живильним середовищем. Далі інокульовані експланти переносять на 1-2 доби

на середовище для кокультивування для того, щоб відбувся перенос Т-ДНК. Під час кокультивування ефективність переносу Т-ДНК сильно залежить від життєздатності штаму *A. tumefaciens* та оптимальної температури (+26...+28°C). Культивування навіть при +19°C негативно впливає на ефективність трансформації (Vinterhalter et al., 2008).

Після кокультивування до середовища додають певні антибіотики для інактивації залишків бактерії, найчастіше використовують 500-1000 мг/л карбеніциліну чи 250-300 мг/л цефотаксиму – такі концентрації антибіотиків не спричиняють негативного впливу на життєздатність експлантів. Іноді для елімінації агробактерії у середовище додають тіментин або ванкоміцин. Найбільш ефективним антибіотиком для селекції картоплі є канаміцин, який, у разі, якщо векторна конструкція містить ген *nptII* стійкості до канаміцину, використовують в концентрації 50-100 мг/л. Зазвичай, після 2-3 тижнів культивування на селективному середовищі експланти являють собою суміш некротичних, вмираючих, нетрансформованих клітин та здорових трансформованих. Менш широко як селективні агенти використовують гігроміцин, блеоміцин або фосфінотрицин (Vinterhalter et al., 2008).

Під час селекції відбір трансгенних рослин можливо здійснювати як шляхом прямої, так і непрямой регенерації. Під час прямої регенерації, пагони регенерують безпосередньо із меристематичних клітин експланту без етапу дедиференціації та утворення калюсу. Пряма регенерація відбувається на середовищі для індукції соматичного ембріогенезу, і вона є більш ефективною, оскільки за неї зменшується соматональна мінливість. Так, у роботі (Bakhsh, 2020) описано ефективну методику трансформації 5 різних сортів картоплі із застосуванням лише одного середовища для регенерації. Пряму регенерацію вдалось досягти шляхом підбору оптимальної комбінації фітогормонів (БАП, ГК, НОК, зеатину) для кожного із досліджуваних сортів. Ефективність трансформації, яку оцінювали за допомогою гістохімічного аналізу експресії репортерного гена *gus*, становила від 10 до 22%. Як експланти використовували листові диски та міжвузля, а ефективність трансформації була вищою при

використанні міжвузлів як експлантів. Перевага описаної методики – її простота (для отримання регенерантів використовують лише одне середовище) та універсальність для різних сортів. Інше дослідження, в якому було підібрано умови для прямої регенерації рослин різних сортів картоплі, було опубліковано у 2017 р. (Kaur et al., 2017). В даній роботі описано методику прямої регенерації 8 сортів картоплі на середовищі МС, доповненому 10 мкМ БАП, 15 мкМ ГК та 10 мкМ AgNO_3 .

Непряма регенерація відбувається у два етапи. На першому етапі здійснюється індукція калюсу на поверхні експланта за використання високих концентрацій ауксинів у складі середовища, на другому етапі – з ембріогенного калюсу відбувається регенерація пагонів при культивуванні на середовищі, що містить цитокініни та ауксини, або гібереліни у низькій концентрації (Vinterhalter et al., 2008). У дослідженні (JayaSree et al., 2001) описано методику отримання регенерації рослин картоплі шляхом соматичного ембріогенезу. На першому етапі, калюс отримували після 2 тижнів культивування листкових дисків на середовищі, яке містило 0,9 мкМ 2,4-Д та 10 мкМ БАП, на 2 етапі після 2 тижнів культивування калюсу на середовищі, що містило 14,4 мкМ ГК та 4,6 мкМ зеатину або 10 мкМ БАП, було відмічено регенерацію пагонів. Ефективність регенерації становила 24-30%.

Також, серед генетично модифікованих ліній можуть бути відмінності у рівні експресії трансгенів, а отже, важливим фактором є стабільність експресії трансгена протягом багатьох наступних поколінь та максимально тривалого часу (Chakravarty et al., 2007; Bruce & Rupp, 2019). Серед факторів, що можуть впливати на стабільність експресії трансгена, найбільш визначними є гетерозиготність ознаки, соматклональна мінливість, метилювання ДНК. Для підвищення рівня експресії нерослинних (бактеріальних, тваринних або грибних) генів іноді необхідне використання специфічних промоторів або сигнальних послідовностей, які регулюють активність цих генів (Chakravarty et al., 2007; Bruce & Rupp, 2019).

Основні властивості, на які спрямовано генетичну трансформацію картоплі, це: 1) смакові якості та поживна цінність бульб, які є привабливими для споживачів, 2) висока врожайність, а також 3) стійкість до біотичних та абіотичних стресів, що позитивно впливає і на якість, і на кількість врожаю (Chuntale, 2018).

Першим генетично модифікованим сортом картоплі був сорт Russet Burbank, отриманий компанією NatureMark (філіал Monsanto) у 1995 р. Новий сорт, зареєстрований під назвою NewLeaf, містив ген *cry3A*, що забезпечує стійкість до колорадського жука. Під даною назвою також було зареєстровано 2 інших сорта (Atlantic та Superior), що також несли ген *cry3A*. В 1998 році сорт NewLeaf вирощували на 55 000 акрах. Також, у 1998 році фірма NatureMark представила новий сорт NewLeaf Plus, створений на основі сорту Russet Burbank, який, окрім гена *cry3A*, містив також ген стійкості до вірусу скручування листя картоплі (PLRV). Однак внаслідок пресингу анти-ГМО руху ці сорти були вилучені з ринку у 2002 р (Chuntale, 2018).

Враховуючи досвід Monsanto, компанія Simplot працювала над генетичним покращенням характеристик, важливих для споживачів, а саме, над зниженням схильності до утворення акриламідів під час термічної обробки та зниженням рівня потемніння м'якоті бульб при контакті з повітрям (за рахунок інгібування гена поліфенолоксидази (*pro*)). В 2015 р. компанія Simplot представила ринку новий сорт картоплі Innate 1.0, який був розроблений на основі сортів Atlantic, Russet Burbank та Ranger Russet. Сорт Innate 1.0 мав знижений рівень утворення акриламідів та був стійкий до потемніння. У цьому ж 2015 р. компанія Simplot продовжила біотехнологічні розробки та створила новий сорт картоплі Innate 2.0, який, окрім вище зазначених ознак, не накопичував цукри при зберіганні на холоді (Chuntale, 2018).

Серед інших генномодифікованих сортів, які були створені в Європі, були сорт Amphlora, створений у 1997 р. фірмою BASF, та Modena, створений фірмою AVEBE. Бульби даних сортів картоплі мали високий вміст амілопектину, в той час як синтез амілози був інгібований шляхом сайленсингу

гена *granule-bond starch synthase (GBSS)*. Третій генетично модифікований сорт картоплі *Amadea* також мав підвищений вміст амілопектину. Однак, ці сорти також не були допущені до продажу (Halterman et al., 2016; Chuntale, 2018).

Сорт *Fortuna*, також створений фірмою BASF, містив 2 гена стійкості до *Phytophthora infestans*, *Rpi-blb1* та *Rpi-blb2*, із систематично близького виду *Solanum bulbocastanum*. Дані гени були перенесені у геном рослин картоплі шляхом генетичної трансформації (Halterman et al., 2016). Ефект впливу вирощування трансгенної картоплі був оцінений на 15 видах комах, 69 видах грибів, 2 видах бактерій та 8 видах нематод. В результаті польових випробувань було виявлено вплив трансгенної картоплі на нецільові маркерні види агроecosистеми, а саме, було виявлено зниження інтенсивності розмноження попелиці *Myzus persicae*, а отже, даний сорт не був допущений до комерційного вирощування (Gillund et al., 2011, Lazebnik et al., 2017; De Steur et al., 2019). Однак, паралельно проводили дослідження із трансформації картоплі іншими генами стійкості до фітофторозу із диких видів *Solanum*. У дослідженні (Foster et al., 2009) було ізольовано ген *Rpi-vnt1.1* із *S. venturii* та отримано трансгенні лінії картоплі сорту *Desiree*, що експресують ген *Rpi-vnt1.1*. У дослідженні (Jones et al., 2014) було ізольовано із *S. mochiquense* ген *Rpi-mcql* та перенесено у лінії картоплі сорту *Desiree*. У даній роботі протягом 3 років (2010-2012) проводили польові дослідження отриманих ліній, в результаті яких було показано, що трансгенні лінії картоплі з геном *Rpi-vnt1.1* були стійкими до зараження *P. infestans*.

Також, проводили інші дослідження з генетичної модифікації картоплі, в результаті яких було отримано лінії із покращеними поживними властивостями, зокрема, підвищеним синтезом β -каротеноїдів за рахунок перенесення гена *Or* (Cauliflower orange gene, що відповідає за синтез провітаміну А) (Nameed et al., 2018) та модифікації рівнів експресії генів, що відповідають за синтез каротиноїдів (Ahn et al., 2010), підвищеним вмістом вітаміну Е за рахунок експресії генів р-гідроксифенілпіруват дегідрогенази (*At-HPPD*) та гомогентизат фітилтрансферази (*At-HPT*) *A. thaliana* (Crowell et al.,

2016), підвищеним вмістом ліпідів в результаті інтеграції генів *WRINKLED 1* (*WR11*), діацилгліцерол ацилтрансферази 1 (*DGATI*) та олеозину (*OLEOSIN*) (Liu et al., 2017), підвищеним вмістом фолату (вітаміну B9) за рахунок трансформації рослин картоплі чотирма генами біосинтезу фолату (*GTPCHI*, *ADCS*, *HPPK/DHPS* та/або *FPGS*) (Lepeleire et al., 2018), підвищеним вмістом фосфатних залишків за рахунок інтродукції гена лафорину (Xu et al., 2017), зниженим вмістом α -соланіну та хаконіну (Halterman et al., 2016), та деякі інші трансгенні лінії із підвищеним вмістом поживних речовин, наведені в огляді (Patil et al., 2016). В оглядовій статті (Dangol et al., 2018) охарактеризовано стратегії щодо підвищення стійкості рослин картоплі до абіотичних факторів за використання методів генетичної інженерії, наприклад, підвищення посухостійкості за рахунок експресії гена *AtYUC6*, що відповідає за біосинтез ІОК *A. thaliana*, або за рахунок експресії генів, що відповідають за синтез осмопротекторів, таких як генів трегалозо-6-фосфат синтази дріжджів (*TPS1* та *TPS2*) (Dangol et al., 2018; Кваско та ін., 2020) та ін. Крім того, в оглядових статтях (Dangol et al., 2018; Dahal et al., 2019) охарактеризовано деякі стратегії щодо підвищення солестійкості трансгенних ліній картоплі, наприклад, за рахунок перенесення генів солестійкості родини *DREB-1* до геному картоплі, покращення холодостійкості, зокрема, за рахунок інтеграції гена ацил-ліпід 12-десатурази (*desA*) ціанобактерії *Synechocystis* sp у геном картоплі.

Хоча минуло вже 30 років після публікування перших робіт із використання *cry*-генів для підвищення стійкості рослин до комах шкідників, подібні дослідження досі не втратили актуальність. Так, у (Amiri & Bakhsh, 2019) повідомляють про отримання трансгенних ліній картоплі із геном *cry1Ac*, стійких до колорадського жука та картопляної молі. Окрім *cry*-генів, для підвищення стійкості рослин картоплі до шкідників можуть бути використані інші гени. Зокрема, у (Green et al., 2012) автори повідомляють про отримання трансгенних ліній картоплі із синтетичним геном *nAChRbp*, який кодує пептид бактеріофага СТТМНРЛС, що перешкоджає хеморецепції нематоди *G. pallida*. Також, за використання методів генетичної інженерії можливе застосування

бульб картоплі як біофабрик, наприклад, для синтезу рекомбінантного альбуміну сироватки людини у кількості 0,2 г/кг тотального білка), або для створення їстівних вакцин – наприклад, експресія гена *gp120* білка вірусу імунодефіцита людини HIV або антигена HBsAg вірусу гепатита В (Mullins et al., 2006).

Отже, хоча на сьогоднішній день для покращення властивостей рослинних культур, зокрема, картоплі, все ширше використовують технології редагування геному, такі як CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) або TALEN (Transcription activator-like effector nucleases), (Dangol et al., 2019; Johansen et al., 2019), застосування підходів генетичної інженерії для покращення властивостей цінних сортів картоплі є досі актуальним, оскільки дозволяє напряду здійснювати перенесення генів важливих ознак до геномів цінних сортів. Важливо також зазначити, що ризики використання ГМ картоплі є низькими: коефіцієнт можливості вивільнення трансгена у навколишнє середовище шляхом передачі з пилюком або насінням є порівняно низький і становить 6 із 27 (Flannery et al., 2005), що є результатом низької статевої сумісності із дикими видами, такими як *Solanum nigrum* або *S. dulcamara* (Halterman et al., 2016; Mullins et al., 2006).

1.2. Біотехнологічні підходи щодо покращення характеристик томату

Після картоплі, томат є другою за значенням овочевою культурою, і Україна входить до двадцятки світових лідерів за продукцією томатів (Kovaliv, 2018; Khalatur, 2017; van Leeuwen et al., 2012). Так, в 2019 р. загальний об'єм врожаю томатів в Україні становив 2,2 млн. т (http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity).

Плоди томатів споживають свіжими, консервованими та у переробленому стані. Хоча енергетична цінність томатів є невисокою (вміст сухої речовини в плодах становить менше 10%, калорійність – 22 ккал на 100 г сировини), як і бульби картоплі, плоди томатів збагачені на калій, кальцій, натрій, магній,

фосфор, залізо. Завдяки високому вмісту вітамінів (С, А, Е, вітамінів групи В), біологічно активних речовин та антиоксидантів, томати є корисними для здоров'я. Серед біологічно активних речовин, що містяться у плодах томатів, найбільш важливими є каротиноїди та лікопін – ці речовини мають протизапальні, антимікробні, антиалергенні, антиоксидантні та протиракові властивості (Логоша, 2012; Benton, 2007; Viuda-Martos et al., 2014; Agarwal & Rao, 2000).

Томат (*Lycopersicon esculentum* Mill.) – однорічна трав'яниста рослина із розгалуженим стеблом висотою від 30 см до 2 м та розвинутою стрижневою кореневою системою, яка проникає в ґрунт на глибину до 1 м. Листки непарноперисті, розсічені на великі долі. Томати є вимогливими до тепла та світла рослинами. Проростання насіння починається за температури 10-15°C, оптимальною для вегетації є температура 20-25°C. За температури вище 30°C та нижче 10°C інтенсивність метаболічних процесів знижується. Для інтенсивного росту та плодоношення тривалість світлового дня повинна становити не менше 12 год. Томат є дуже чутливою культурою до рівня зволоженості ґрунта та повітря. Досягнення високих рівнів схожості насіння та врожаю можливе лише при зрошенні, але надмірне зволоження також негативно впливає на ростові процеси. Так, при надмірному поливі та вологості повітря вище 60% погіршується ефективність запилення і збільшується кількість хворих рослин. За тривалістю періоду досягання плодів розрізняють ранньостиглі (80-100 днів), середньоранні (100-115), середньостиглі (115-125) та пізньостиглі (125-145 днів) томати. В умовах надмірного зволоження у весняний та осінній період збільшується вірогідність зараження різними фітопатогенами ранньостиглих, середньоранніх та пізньостиглих сортів томатів (Benton, 2007; Саблука та ін., 2009).

На території України вирощують сорти та гібриди томатів вітчизняної та зарубіжної селекції, що відрізняються за призначенням, морфологічними характеристиками рослин, біохімічним складом плодів та рівнем стійкості до

фітопатогенів (Терьохіна, 2012; Яновський та ін., 2013; Люта та Кобиліна, 2014; Кобиліна та ін., 2018; Коваленко та Сидякіна, 2019).

Завдяки таким характеристикам, як короткий життєвий цикл, здатність до регенерації цілих рослин із різних експлантів, можливість до самозапилення, невеликий геном, наявності високоточних генетичних карт, охарактеризованих мутантів плодів, ефективним методикам стабільної трансформації, томати є важливим модельним об'єктом для досліджень росту та розвитку рослин, взаємодії із фітопатогенами, процесу досягання плодів, а також об'єктом досліджень генетичної інженерії (Ali et al., 2014; Gerszberg et al., 2015, Arie et al., 2007).

1.2.1. Особливості культивування in vitro рослин томатів. Для покращення сортів томатів за використання сучасних біотехнологічних підходів, а саме, для мікроклонального розмноження промислово цінних сортів, отримання безвірусного рослинного матеріалу та для генетичної трансформації, важливою умовою є розробка простих та ефективних методик культивування та регенерації рослин томатів (Fentik, 2017).

Регенерація *in vitro* – процес, при якому із окремих частин рослин при пораненні формуються нові органи і навіть цілі рослини (Bidabadi & Jain, 2020). Органогенез – процес, при якому на експлантах формуються нові тканини та органи (Bidabadi & Jain, 2020). При соматичному ембріогенезі спочатку формуються клітини, подібні до клітин ембріонів, із яких потім регенерує ціла рослина (Bidabadi & Jain, 2020). Органогенез відбувається в результаті дедиференціації клітин та реорганізації клітинного поділу для формування примордію органу та меристем, та приєднання нового органу до судинної системи (Bidabadi & Jain, 2020). Під час регенерації, рослинні клітини проходять стадії дедиференціації, трансдиференціації, клітинного поділу та клітинної смерті (Bidabadi & Jain, 2020).

Оскільки різні сорти томатів мають різний морфогенетичний потенціал, удосконалення методів регенерації пагонів із адвентивних бруньок є важливим завданням (Gerszberg et al., 2015). В роботі (Plana et al., 2005) описано простий

та зручний метод отримання регенерантів та мікроклонального розмноження томатів. Для цього, проксимальну частину гіпокотилів проростків томатів 5 різних сортів культивували на безгормональному середовищі МС, доповненому міо-інозитолом та тіаміном, рослини пересаджували кожні 2 тижня. Переваги даного методу у його швидкості, універсальності та відсутності потреби у внесенні фітогормонів у живильне середовище (Plana et al., 2005).

За ефективністю регенерації пагонів, експланти томатів можна розмістити у такій послідовності: сім'ядольні листки>гіпокотилі>листки. Також, важливе значення має вік експланта та його розмір. Оптимальний розмір сім'ядольного листка – 5x5 мм (Gerszberg et al., 2015). Більш високі показники регенерації пагонів були отримані при культивуванні на середовищі В5 у порівнянні з середовищем МС (Gerszberg et al., 2015). Ріст та регенерацію пагонів можна покращити шляхом додавання органічних речовин, зокрема, вітамінів та міо-інозитулу (Gerszberg et al., 2015). Також, було досліджено вплив на регенерацію таких індукторів, як амінокислот, джерела світла, слабого електричного поля та деяких антибіотиків (Bidabadi & Jain, 2020). Максимальний рівень регенерації було показано при культивуванні експлантів при освітленні LED-лампкою та 16/8-годинному фотоперіоді (Gerszberg et al., 2015). На ефективність регенерації також може позитивно впливати абіотичний стрес та такі антибіотики, як карбеніцилін, тіментин, цефотаксим – ймовірно, завдяки подібності структури їх молекул до ауксинів (Bidabadi & Jain, 2020).

Поранення тканин є одним з основних факторів, необхідних для регенерації. В результаті поранення відбуваються зміни в експресії генів біосинтезу гормонів, в результаті чого підвищується акумуляція цитокінінів та утворюється калюс у місці поранення (Bidabadi & Jain, 2020). На важливі етапи регенерації – індукцію запрограмованої загибелі клітин, синтез фітогормонів, диференціацію клітин, – негативно впливає утворення активних форм кисню (ROS) (Bidabadi & Jain, 2020). Слід зазначити, що численні пасажі протягом тривалого часу під час мікроклонального розмноження можуть індукувати соматоклональну варіабельність калюсу та недиференційованих клітин. Інші

фактори, що можуть індукувати соматональну варіабельність, є наступними: стерилізація експлантів, порушення балансу фітогормонів, вологості або освітлення, оксидативний стрес, та ін. (Bidabadi & Jain, 2020). Окрім соматональної варіабельності, при тривалому пересажуванні може відбутись метилювання або/та сайленсінг деяких генів. В результаті процесів метилювання ДНК може знижуватись ефективність регенерації (Bidabadi & Jain, 2020). Деякі рослини, отримані в результаті мікроклонального розмноження, можуть мати дефекти розвитку, зокрема такі, як знижений рівень фотосинтезу та порушення процесу формування восків куликули, як результат соматональної варіабельності (Bidabadi & Jain, 2020).

Також, в недавніх дослідженнях було показано, що на ефективність росту та регенерації томатів в умовах *in vitro* позитивно впливає додавання у середовище синтетичних сполук або фітостимулюючих речовин мікробного походження. Так, у роботах (Могільнікова та ін., 2020; Tsygankova et al. 2018, 2019) було показано, що синтетичні сполуки-похідні піримідинів у концентраціях 10^{-8} - 10^{-9} М підвищують частоту проростання насіння томатів, довжину пагонів, довжину та кількість коренів та стимулюють пряму регенерацію на експлантах томатів. В іншому дослідженні (Tsygankova et al., 2017) було показано здатність біостимуляторів мікробного походження стимулювати органогенез та соматичний ембріогенез на калюсі пшениці. Отже, синтетичні сполуки - похідні піримідинів та біостимулятори мікробного походження можуть бути використані для підвищення ефективності росту та регенерації томатів в умовах *in vitro*.

1.2.2. *Особливості генетичної трансформації L. esculentum.* Вперше *Agrobacterium*-опосередкована трансформація томатів була здійснена McCormick у 1986 р, однак на сьогоднішній день *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in vitro* деяких сортів томатів, як і картоплі, досі пов'язана з певними складностями, обумовленими низькою здатністю до регенерації деяких сортів (Gerszberg et al., 2015).

Іноді для трансформації томатів використовують інші методи трансформації рослин, наприклад, метод *in planta*. Недоліком даного методу є те, що трансформовані квіти томатів іноді потім не можуть сформувати плоди (Gerszberg et al., 2015).

Іншою проблемою, пов'язаною з *Agrobacterium*-опосередкованою трансформацією рослин *in vitro*, є те, що трансгенні рослини можуть набувати неочікуваних фенотипових ознак. В дослідженні (Wang & Campbell, 2008) антисенсові послідовності двох стрес-індукованих генів (*LeTGA1* та *SOLLyGLB1*) були перенесені в геном томатів. В результаті трансформації було отримано мутантні лінії зі зміненою структурою квітів. Такий результат інтеграції антисенс послідовностей стрес-індукованих генів до MADs-гомеобоксу, гени якого відповідають за структуру квітів, був неочікуваним, оскільки структура генів гомеобоксу не була порушена в результаті вбудовування чужорідних послідовностей ДНК. Автори вважають, що отриманий ефект може бути результатом порушення експресії генів гомеобоксу (Wang & Campbell, 2008).

Загалом, ефективність трансформації томатів залежить від аналогічних факторів, що й ефективність трансформації картоплі: додавання ацетосирингону у середовище, штаму *A. tumefaciens*, щільності бактеріальної суспензії, генотипу, типу експлантів, складу середовища для культивування, концентрації антибіотиків, часу кокультивування, та ін (Gerszberg et al., 2015).

Першою генетично модифікованою рослиною, створеною фірмою Calgene для комерційних потреб, був томат Flavr Savr. Для створення томату Flavr Savr, ген полігалактуронази (*PG*) було ізольовано з рослин томатів та перенесено у геном рослин у зворотній послідовності (Kramer & Redenbaugh, 1994). За використання технології антисенс-РНК було досягнуто зниження рівня гідролізу пектинів у дозріваючих плодах томатів, в результаті чого плоди генномодифікованих рослин томатів залишались свіжими протягом більш тривалого часу, ніж плоди контрольних рослин (Kramer & Redenbaugh, 1994). Компанією Calgene було проведено більш ніж 10 польових випробувань на 400

акрах у Каліфорнії, Флориді, Мексиці (Kramer & Redenbaugh, 1994). Відсутність фермента полігалактуронази у досягаючих плодах покращила стійкість плодів до зараження деякими фітопатогенами. Крім того, за відсутності фермента полігалактуронази в'язкість соку трансгенних плодів була вищою, ніж плодів контрольних ліній (Kramer & Redenbaugh, 1994). В результаті дослідження біохімічного складу плодів томатів було виявлено, що відсутність полігалактуронази впливає лише на наявність пектинів та не має ефекту на вміст вітамінів, мінералів та поживних речовин, а також, не підвищує вміст такої токсичної речовини, як томатін (Kramer & Redenbaugh, 1994). Також, сайленсинг гена *PG* не впливав на морфо-фізіологічні параметри рослин, зокрема на темпи росту, час цвітіння та закладання плодів, їх розмір та форму (Kramer & Redenbaugh, 1994). Автори зазначають, що антисенс послідовність гена *PG* не надає селективної переваги трансгенним лініям у порівнянні із нетрансгенними щодо неконтрольованого розповсюдження у навколишньому середовищі (Kramer & Redenbaugh, 1994). Компанією Calgene також було підтверджено відсутність токсичного впливу та алергенності трансгенних томатів, що експресують ген *kan^r* (Kramer & Redenbaugh, 1994). Успадкування перенесеного гена *PG* відбувалась за законом Менделя протягом 5 поколінь (Kramer & Redenbaugh, 1994). Трансгенний томат з'явився у продажу у 1994 р., його продавали у магазинах Чікаго та в штаті Каліфорнія (Kramer & Redenbaugh, 1994). За результатами проведених досліджень FDA надала висновок, що генномодифіковані томати Flavr Savr є такими ж безпечними, як і томати, отримані традиційними методами (Kramer & Redenbaugh, 1994). Однак, за оцінкою споживачів, смакові якості томату сорту Flavr Savr були низькими. Цю проблему можливо подолати шляхом схрещування ГМ сорту із більш смачним, не модифікованим сортом (Fentik, 2017).

Інший сорт трансгенних томатів - Bs2, які несуть ген *Bs2* перцю, були отримані компанією Two Blades Foundation. Щонайменш 5 генів *Bs* (*Bs1*, *Bs2*, *Bs3*, *Bs5*), які забезпечують стійкість до бактеріальної крапчастості (збудниками якої є бактерії роду *Xanthomonas*) були перенесені в комерційні сорти (Hutton et

al., 2015). В іншому дослідженні (Wittmann et al., 2019) для підвищення стійкості рослин томатів до *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, було здійснено їх трансформацію геном ендолізіна (*lys*) бактеріофага СМР1, білковий продукт якого гідролізує муреїн. В результаті трансформації трансгенні рослини не виявляли симптомів бактеріального раку після зараження даним патогеном. Альтернативним підходом до підвищення стійкості рослин томатів проти фітопатогенів є застосування технології редагування геному. В роботі (Morcillo et al., 2020) шляхом *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації було здійснено RNAi-опосередкований сайленсинг гена *SICESA6* томатів, що відповідає за синтез вторинної клітинної стінки рослин, в результаті чого було показано підвищення стійкості трансгенних рослин до *R. solanacearum*. У дослідженні (Martínez et al., 2020) було здійснено CRISPR/Cas9-опосередкований сайленсинг гена *PMR4*, в результаті чого було показано підвищення стійкості модифікованих ліній до гриба *Oidium neolycopersici*, збудника борошнистої роси томатів.

Крім того, опубліковано цілий ряд робіт із генетичної трансформації томатів для підвищення їх стійкості до несприятливих абіотичних факторів. Одним із підходів до підвищення стійкості до абіотичного стресу є підвищення синтезу молекул антиоксидантів, таких як аскорбат (вітамін С). У роботі (Broad et al., 2020) розглянуто стратегії генетичної модифікації метаболічних шляхів біосинтезу аскорбату модельних видів рослин, зокрема, томатів, для підвищення рівня синтезу цієї речовини з метою покращення стійкості рослин до абіотичного стресу. В оглядових статтях (Gerszberg & Hnatuszko-Konka, 2017; Krishna et al., 2019) охарактеризовано інші стратегії покращення стійкості рослин томатів до абіотичного стресу за використання методів генетичної інженерії, зокрема, модифікації шляхів синтезу протекторних речовин, таких як глутатіон (GS), гліцин бетаїн (GB), а також модулювання рівнів синтезу фітогормонів та транскрипційних факторів, що приймають участь захисті рослин від абіотичного стресу.

Також, за використання методів генетичної інженерії можливе підвищення якості плодів томатів за рахунок модифікації шляхів біосинтезу каротиноїдів та інших метаболічних шляхів, що приймають участь у процесі досягання плодів (Cocaliadis et al., 2014). У дослідженні (Vallarino et al., 2020) показано можливість застосування генетичної інженерії для підвищення врожайності томатів. Авторами було здійснено множинну біолістичну трансформацію рослин томатів більш ніж 20 генами, що беруть участь у процесах обміну вуглеводів та амінокислот, і в результаті було отримано трансгенні лінії, врожайність яких була на 23% вищою, ніж у контрольних. Альтернативним підходом до модифікування процесу досягання плодів томатів є використання технології редагування геному, практичне застосування якої охарактеризоване в оглядовій статті (Martín-Pizarro & Pose, 2018). Також, технології редагування геному можуть бути застосовані для підвищення врожайності томатів. У роботі (Tomlinson et al., 2019) показано, що CRISPR/Cas9-опосередкований сайленсинг гена *PROCERA*, що відповідає за чутливість до гіберелінів, призводить до утворення більш врожайного карликового фенотипу у томатів.

Таким чином, покращення сортів томатів за використання біотехнологічних підходів проводять у аналогічних напрямках, як і генетичну модифікацію сортів картоплі: підвищення стійкості до високих та низьких температур, посухи, засолення, покращення смакових якостей та вмісту поживних речовин, модифікації біосинтетичних шляхів та реакцій фотосинтезу для збільшення продуктивності, використання плодів томатів для біосинтезу корисних речовин та для підвищення стійкості трансгенних рослин до комах, нематод, грибів, бактерій та вірусів (Ali et al., 2014; Paduchuri et al., 2010; Fentik, 2017)

Отже, за використання методів генетичної інженерії можливо досягти покращення не лише поживних властивостей цінних сортів томатів, але і їх стійкості до фітопатогенів, що також матиме вплив на якість врожаю, зокрема, на зниження контамінації мікотоксинами та іншими небезпечними продуктами життєдіяльності фітопатогенів.

1.3. Найбільш розповсюджені хвороби томатів та картоплі

І картопля, і томати належать до родини Solanaceae, тому мають багато спільних патогенів, які викликають подібні хвороби. В Україні впродовж вегетаційного періоду картопля найчастіше уражується фітофторозом, альтернаріозом, ризоктоніозом, бактеріозами та вірусними хворобами. Так, у 2014-2017 р.р. найбільш поширеними хворобами картоплі в Україні були фітофтороз (зараження 6,1-91,3% площ, збудник – *Phytophthora infestans*), альтернаріоз (зараження 16,1-91,5% площ, збудник – *Alternaria* sp.), фомоз (1-10% територій, *Phoma exigua*), ризоктоніоз (15-43,5%, *Rhizoctonia solani*), фузаріозне в'янення (1-3%, *Fusarium* sp., *Verticillium* sp.), кільцева гниль (23.7-94.8%, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*), чорна ніжка (2-88.3%, *Pectobacterium* sp., *Dickeya* sp), вірусні хвороби (0.7-37.2%) (Бородай та Парфенюк, 2018; Тарасенко та Чечітко, 2006; Тимощук, 2013).

Наступною за шкодочинністю для врожаю картоплі після фітофторозу, є суха гниль картоплі, спричинена грибами роду *Fusarium* (Тарасенко та Чечітко, 2006). В більшості випадків в зоні Полісся України фузаріоз бульб викликає вид *F. sambucinum*, який зустрічався майже в 50% проаналізованих зразків (Тимощук, 2013)

В останні десятиріччя в тепличних господарствах України Одеської, Запоріжської, Дніпропетровської та Миколаївської областей були поширені спалахи бактеріальних хвороб томатів, які супроводжувались в'яненням та загибеллю рослин. Хвороби були викликані, в основному, такими патогенами, як *Xanthomonas vesicatoria* (збудник чорної бактеріальної плямистості), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (збудник бактеріальної крапчастості), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (що викликає бактеріальний рак томатів) (Kolomiiec & Avetisyan, 2014; Kolomiets et al., 2017a, 2017b, 2019a, 2019b; Коломієць та ін., 2014, 2016, 2017; Аветисян та Коломієць, 2014).

Серед грибних хвороб томатів за останні 10 років широкого розповсюдження на території України набули альтернаріоз та фітофтороз. В

епіфітотійні роки ці хвороби здатні знищувати до 60% врожаю (Шотик та ін., 2014; Сергієнко, 2012).

Надзвичайно небезпечним та шкодочинним бактеріальним фітопатогеном, що заражає рослини родини Пасльонові, є *Ralstonia solanacearum*. Цей мікроорганізм є карантинним на території України. На рослинах картоплі даний патоген викликає буру гниль бульб, на рослинах томатів – бактеріальне в'янення. Хоча на території України протягом останніх 15 років не було виявлено очагів зараження *R. solanacearum*, активний імпорту харчових продуктів та насіннєвого матеріалу із країн Європи та сприятливі кліматичні умови України створюють небезпеку занесення даного патогену. Отже, важливим є створення сортів томатів та картоплі, стійких до даного патогена (Грицай та Варбанець, 2012).

1.4. Характеристики основних збудників бактеріальних хвороб томатів та картоплі

Таким чином, для проведення даної роботи було обрано види фітопатогенних бактерій, що заражають і картоплю, і томати, а також є найбільш розповсюдженими та шкодочинними на території України, а саме: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (збудник бактеріального раку томатів), *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (збудник кільцевої гнилі картоплі) та *Ralstonia solanacearum*, що спричиняє бактеріальне в'янення томатів та буру гниль картоплі. Слід зазначити, що дані бактеріальні фітопатогени є карантинними на території України (Про внесення змін до Переліку регульованих шкідливих організмів, 2019).

Clavibacter michiganensis – це біотрофний патоген, здатний заражати широке коло господарів. Наразі відомо 9 підвидів *C. michiganensis*, які заражають рослини родин Злакові, Бобові та Пасльонові. Збудником кільцевої гнилі картоплі є підвид *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, бактеріального раку томатів – *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Burger & Eichenlaub, 2003; PM

7/42 (3), 2016). Це нерухома неспороносна грампозитивна паличкоподібна бактерія із розміром клітин 0,5-1,0 – 0,4-0,6 мкм (Литвак та Левченко, 2002; РМ 7/42 (3), 2016). Природними резервуарами *S. michiganensis* є бур'яни, такі як *Solanum nigrum*, *S. douglasii*, *S. trifolium*, *Datura stramonium*, *Chenopodium album* та *Amaranthus retroflexus*. Джерела зараження – інфіковане насіння та рослинні рештки. Патоген уражує судинну систему та швидко розноситься до всіх тканин та органів рослини (Blancard et al., 2012).

Симптоми прояву кільцевої гнилі картоплі схожі за проявами на симптоми фітофторозу, вертицильозу і бурої гнилі картоплі. Діагностичною ознакою є ураження судинної системи стебла та бульб. На розрізі уражені ділянки м'які, мають лимонно-жовтий колір і однорідну маслянисту структуру. Перші ознаки хвороби виявляються наприкінці цвітіння картоплі як ураження одного або декількох пагонів у кущі. Листки уражених рослин скручуються і засихають (Державна установа “Тернопільська обласна фітосанітарна лабораторія”).

Симптоми бактеріального раку томатів полягають в однобічному ураженні листкових пластинок та судин стебла, які набувають коричневого кольору, уздовж стебла формуються тріщини та виразки, з яких може виділятися бактеріальна маса. На незрілих плодах з'являються групи білих плям. При незначному ураженні симптоми на плодах не помітні, але на розрізі помітні жовті тяжі бактерії, які сягають насінневих камер. На пізніх стадіях захворювання рослина повністю в'яне та гине внаслідок закупорювання бактеріальною масою судинної системи (Гвоздяк та ін., 2009).

Зараження томатів та картоплі бактерією *S. michiganensis* як правило відбувається за високих температур (25-27°C) та вологості повітря (80-85%). Нагромадженню збудника у ґрунті сприяють монокультури, джерелом ураження є неперегнилі рештки рослин. Складність контролю даного фітопатогена обумовлена тривалим латентним періодом розвитку хвороби та широким колом господарів, що належать до родини Пасльонові, що ускладнює ротацію культур (Blancard et al., 2012).

Діагностику та контроль бактеріальних хвороб томатів та картоплі також ускладнює той факт, що, зазвичай, бактеріальні патогени взаємотолерантні – тобто, штами різних видів бактеріальних патогенів (*X. campestris*, *P. syringae*, *C. michiganensis*, *R. solanacearum*) не конкурують за ресурси живлення та ніяк не впливають на ріст одне одного. Таким чином, заражені рослини томатів або картоплі можуть бути колонізовані декількома патогенами (Гвоздяк та ін., 2005, 2009).

Важливо зазначити, що різні підвиди *Clavibacter michiganensis* є вузько спеціалізованими до певного виду рослини господаря, і, таким чином, відрізняються між собою за здатністю заражати лише певний вид рослин (Li et al., 2018). А отже, підвид *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* заражає лише томати та викликає бактеріальний рак, а підвид *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* здатен заражати тільки картоплю та викликати кільцеву гниль її бульб.

Ralstonia solanacearum – біотрофний рослинний патоген, грам-негативна бактерія із паличкоподібними клітинами розміром 0,5-1,5 мкм. Не утворює спор (Грицай та Варбанець, 2012). Цю бактерію відносять до карантинних фітопатологічних мікроорганізмів на території України (Грицай та Варбанець, 2012; Гвоздяк та ін., 2005, 2009; Про внесення змін до Переліку регульованих шкідливих організмів, 2019). Джерелом зараження зазвичай є інфіковане насіння та рослинні рештки. Зараження відбувається через пошкоджені корені. Природні резервуари інфекції – бур'яни *Amaranthus spinosus*, *Chenopodium album*, *Euphorbia hirta*, *Malva* sp., *Solanum nigrum*, *S. dulcamara*, *Vicia* sp., etc (Blancard et al., 2012).

В залежності від господарів, розрізняють п'ять рас *R. solanacearum*, які заражають, в основному, рослини, що належать до родини *Solanaceae*, а також бананові дерева, імбир та шовковицю. В результаті філогенетичного аналізу було описано 4 філотипи та 6 біоварів *R. solanacearum*: Азіатський філотип I (до якого належать біовари 3, 4, 5), Американський філотип II (біовари 1, 2, 2Т та раси 2, 3), Африканський (філотип III, біовари 1 та 2Т), та Індонезійський філотип IV (біотип 1, 2, 2Т) (Blancard et al., 2012; Guarischi-Sousa et al., 2016).

У країнах Європи (Бельгія, Германія, Британія, Нідерланди, Франція, Італія, Іспанія, Греція) було зареєстровано спалахи хвороб рослин, збудником яких була *R. solanacearum* раси 3 (Blancard et al., 2012).

R. solanacearum проникає до судинної системи рослин та швидко розноситься по тканинах та органах. На ранніх стадіях, бактерія вражає судинну систему рослини – на судинних пучках рослини спостерігають некротичні плями бурого кольору. Пошкоджене листя втрачає тургор та в'яне, а згодом – засихає. При зануренні стебла зараженої рослини у воду із зламу стебла виділяються молочно-білі тяжі бактерії. Зараженню сприяють високі температури (25-35°C) та надмірне зволоження ґрунтів (Blancard et al., 2012).

Успішність контролю захворювань, викликаних *R. solanacearum*, залежить від своєчасної та точної діагностики хвороб. Для діагностики використовують методи серійних розведень, імуноферментний аналіз та ПЛР-діагностику. Складність контролю даного патогена пов'язана із здатністю протягом декількох місяців переживати несприятливі умови у глибоких шарах ґрунту (до 30 см), водоймах, на рослинних рештках, у судинній системі бур'янів, довгим латентним періодом хвороби та інфікуванням широкого кола господарів (Yuliar & Toyota, 2015; Huet, 2014; Boschi et al., 2017).

1.5. Характеристики грибних патогенів томатів та картоплі

Серед патогенів рослин, особливу увагу привертає *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary – надзвичайно шкочинний патоген, який завдавав масштабних збитків врожаю картоплі та томатів з середини 19-го ст, проти якого на сьогодні досі не існує ефективних засобів боротьби (Harris, 1992).

P. infestans – гетероталічний гемібіотрофний ооміцет, який ушкоджує всі наземні та підземні органи рослин. Симптоми захворювання з'являються на рослинах через 2-5 днів після зараження: на листках утворюються бурі вологі некротичні плями, на яких у вологий період з'являється білий нальот. Симптоми на незрілих плодах томатів проявляються як ввігнуті виразки бурого

кольору. Зрілі плоди стають повністю бурими, при цьому залишаються щільними (Nowicki et al., 2011; Fry, 2008).

Існує декілька альтернативних джерел зараження та природних резервуарів інфекції:

- ооспори, які утворюються в результаті статевого процесу на заражених рослинних рештках. На стадії ооспор *P. infestans* здатна зберігати життєздатність у ґрунті протягом декількох місяців та навіть років;

- міцелій у заражених бульбах картоплі. На інфікованих пагонах, які проростають із заражених бульб, швидко розпочинається спороношення.

- альтернативні носії, зазвичай, представники родини Solanaceae – *Solanum melongena*, *S. incanum*, *S. indicum*, *Datura stramonium*, *D. metel*, *Hypomea* sp., *Lucium hamilifolium*, *Nicotiana glauca*, *Petunia* sp., *Physalis angulata*, etc (Blancard et al., 2012).

Зараження відбувається за наступним механізмом. Коли спорангій потрапляє на листок, відбувається вихід рухомих дводжгутикових зооспор. Зооспори осідають на поверхні листка, інцистуються та проростають зародковою трубкою, яка утворює апресорії та проникає в тканини листка крізь породи або через клітини епідермісу. Зараження відбувається протягом 3-4 год за оптимальної температури 13°C. Всередині листка в міжклітинному просторі гіфи утворюють гаусторії, за рахунок яких здійснюється біотрофний тип живлення. Перші некротичні плями з'являються протягом 2-5 днів за сприятливої температури (22-24°C). Після успішного зараження, на поверхні інфікованих тканин з'являється велика кількість спорангіїв (24 000/см²), які мають форму лимона. Спорношення відбувається за температури від +3°C до +26°C та 90% вологості повітря. Спорангії швидко розносяться вітром та водою та заражають нові рослини (Blancard et al., 2012, Nowicki et al., 2011; Fry, 2008).

Наявність латентної біотрофної фази фітофторозу ускладнює діагностику та контроль хвороби. Коли з'являються перші некротичні плями, оброблення фунгіцидами не матиме ефекту на розвиток хвороби.

Для здійснення статевого процесу, необхідна наявність міцелію двох протилежних типів спарювання (A1 та A2). Коли міцелії взаємодіють, гормони ініціюють формування гаметангіїв. В результаті мейозу диплоїдний міцелій формує антеридії (A2) та оогонії (A1), які зливаються та формують диплоїдні ооспори. На відміну від тендітних зооспорангіїв, які розносяться вітром та виживають лише за наявності живої тканини, ооспори більші за розміром та оточені товстою стінкою – такі пристосування дозволяють переносити несприятливі умови. Ооспори проростають диплоїдним міцелієм обох типів спарювання (A1 та A2). В результаті статевого процесу збільшується генетична різноманітність *P. infestans* та виникають нові більш агресивні штами.

Фітофтора вперше була завезена в Європу в середині 19 ст. із Мексики. До 1980-х років, в Європі існували лише штами *P. infestans* із A1 типом спарювання. Наразі в країнах Європи та Азії існують популяції фітофтори із A1 та A2 типом спарювання.

Порівняно з іншими страменопілами, *P. infestans* має великий геном розміром 240 млн. п. о. із великою кількістю повторюваних послідовностей. Генетична лабільність фітофтори, що дозволяє ефективно долати захисні стратегії рослин, обумовлена такими особливостями патогена, як: 1) наявність великої кількості некодуючих РНК, 2) експресія псевдогенів, 3) наявність великої кількості нетрансльованих ділянок геному (UTRs) 4) наявність обширних ділянок інтронів, завдяки яким можлива експресія генів за механізмом альтернативного сплайсингу, 5) наявність великої кількості однонуклеотидних поліморфізмів (SNP) (Zuluaga, 2016a, 2016b).

В Україні міцелій типу A2 було вперше ідентифіковано у Львівській області у 1986 р. Протягом 2006-2015 рр., в умовах Західного Лісостепу України відмічали наявність штамів фітофтори із міцелієм A1 та A2 типів спарювання із переважанням типу A1. В Україні для боротьби із фітофторозом застосовують як хімічні препарати, так і препарати біологічної дії та проводять селекцію сортів томатів та картоплі на стійкість до цього збудника. Більшість сортів картоплі, що вирощують в Україні, мають середню стійкість до

фітофтори. При цьому, раси фітофтори, специфічні до томатів, здатні також заражати рослини картоплі, в той час як інфікування томатів штамми, специфічними до картоплі, є менш вірогідним (Ващишин та Добровецька, 2016; Голячук, 2012; Бабаянц та ін., 2014).

На території України виявлено дві томатні раси фітофтори – T1 та T0, при цьому раса T0 є менш агресивною. Протягом 2006-2010 років раса T0 була домінуючою. Однак, вирощування чутливих до фітофторозу сортів томатів на значних площах може сприяти зростанню частки високо вірулентної раси, що сприятиме розвитку епіфітотій (Скрипник, 2012, 2013).

Ще одними небезпечним фітопатогенами, що заражають різні культурні рослини, зокрема, *Solanum tuberosum*, є представники родини *Fusarium* sp. Суха фузаріозна гниль бульб картоплі є хворобою зберігання. В Україні, збудниками сухої фузаріозної гнилі картоплі найчастіше є *F. sambucinum*, *F. solani*, *F. oxysporum*. Суха гниль картоплі розповсюджена всюди, де вирощують картоплю, і за шкодочинністю дана хвороба не поступається фітофторозу. Насінневий матеріал, вражений фузаріозною гниллю та висаджений у ґрунт, стає причиною зрідження посадок та недобору врожаю. Хворі бульби є причиною затримки росту та розвитку рослин під час вегетації та передчасного в'янення. Втрати бульб від ураження сухою фузаріозною гниллю під час зберігання становлять 7-23%, а за умов підвищеної вологості – до 60% (Stefańczyk et al., 2016; Тимощук, 2013; Тарасенко та Чечітко, 2006).

Суха гниль картоплі не тільки знижує об'єм урожаю, але й контамінує бульби мікотоксинами, які мають цито-, гено-, нейро- та гепатотоксичний вплив на тваринний та людський організми (Batur-Ciesniewska et al., 2015). Серед токсинів, які продукує *Fusarium sambucinum*, основними є тіотецени (15-моноацетоксиспірпенол та 4,15-діацетоксиспірпенол), самбутоксин та еніатин (Okungbowa & Shittu, 2012).

Види *Fusarium* – ґрунтові патогени, які заражають судинну систему рослин господарів. В життєвому циклі видів *Fusarium* можна виділити стадії покоя, інвазії та фінальну, сапротрофну стадію, під час якої формуються

спороношення патогена. Отже, види *Fusarium* є сапротрофними, або некротрофними патогенами. Під час стадії спокою, життєдіяльність всіх життєвих форм гриба (міцелію, хламідоспор, мікро- та макроконідій) інгібується за рахунок мікостазу. Під час стадії інвазії відбувається проникнення до коренів, колонізація ендодерми та кореневого кортексу, переміщення до ксилеми стебла та листя, розвиток симптомів (в'янення, затримка росту) та рання загибель рослини. Під час сапротрофної стадії формуються спороношення, на даній стадії гриб переносить несприятливі умови. Проростання спор стимулюють кореневі екsudати рослини-господаря або контакт із свіжими не колонізованими рослинними залишками. Після успішної колонізації судинної системи господаря, всередині ксилеми на міцелії формуються мікрskonідії, які переносяться судинною системою, проростають та утворюють нові гіфи, в результаті чого відбувається ампліфікація симптомів та, на фінальній стадії інфекції, загибель рослини господаря (Okungbowa & Shittu, 2012).

В життєвому циклі *Fusarium* spp. присутні статеві та нестатеві стадії. Як і у більшості грибів, види *Fusarium* гаплоїдні протягом більшої частини життєвого циклу. Гаплоїдний міцелій формується під час обох стадій. Протягом нестатевої стадії, в результаті апоміксису міцеліальні структури формують 3 типи мітотичних спор: мікрskonідії в конідіофорах, макроконідії в спородохях та хламідоспори на гіфах та у макроконідіях. Нестатеві спори (конідії) формуються на поверхні інфікованих рослин або їх залишків під час вологих періодів. Конідії формуються у слизистих подушкоподібних структурах строми гриба (спородохях). Веретеноподібні конідії розносяться із повітрям та краплями води, заражають рослинні тканини та контамінують насінневий матеріал мікотоксинами (Dweba et al., 2017).

Статеве розмноження розпочинається із формування гіфи із двоядерними клітинами (двоядерна фаза, типова для представників відділу Ascomycota). *F. sambucinum* – гетероталічний двостатевий вид, отже, для утворення аскоспор необхідний контакт міцелію двох різних статей. Із двоядерних клітин *F.*

sambucinum формуються ініціальні клітини, з яких надалі утворюються плодові тіла – чашоподібні перитеції, наповнені асками. Аски представлені трубчастими мішечками, що наповнені аскоспорами, які сформувались в результаті мейоза. Аскоспори вивільняються із асків через устя перитецію. На статевій стадії *F. sambucinum* переносить несприятливі умови під час зимового періоду (Dweba et al., 2017; Trail, 2009; Desjardins et al., 1991).

Fusarium sambucinum утворює веретеновидні еліптично вигнуті макроконідії в повітряному міцелії, піонотах та зрідка в спородохіях. Конідії мають 5, рідше 3 перетинки. Спороншення рожево-помаранчевого кольору. Повітряний міцелій білий, блідо-червоний, рожевуватий, сильно пухнастий або щільний. Строма жовта, яскраво-червона.

В більшості випадків в зоні Полісся України фузаріоз бульб викликає вид *F. sambucinum*, який зустрічався майже в 50% проаналізованих зразків. Найефективнішим методом боротьби з сухою фузаріозною гниллю бульб картоплі є створення стійких сортів, але наразі немає сортів картоплі з високою стійкістю проти даної хвороби, що може бути обумовлено змішаним видовим складом *Fusarium* spp, які колонізують окремі рослини (Тимощук, 2013). Так, в роботі (Тарасенко та Чечітко, 2006) було проаналізовано стійкість 173 сортів картоплі до сухої фузаріозної гнилі, і серед проаналізованих сортів не було виявлено таких, що мають хоча б відносно високу стійкість до даної хвороби.

1.6. Контроль над хворобами та стратегії щодо створення стійких до них рослин

Оскільки в Україні картоплю вирощують, в основному, у приватних господарствах, більшість виробників картоплі використовує для садіння несертифікований матеріал багаторічних репродукцій, який значною мірою уражений вірусами, бактеріями і грибами, що створює сприятливі умови для накопичення патогену та розвитку епіфітотій. Крім того, в результаті потепління клімату відбувається зміна екології рослинних фітопатогенів –

більш ранні прояви хвороб, збільшення агресивності та вірулентності фітопатогенів – такі умови сприяють розвитку епіфітотій (Чередниченко, 2013). Така тенденція характерна для багатьох країн Східної Європи. Крім того, більшість іноземних сортів картоплі, які вирощують на території України, не пристосовані до наших ґрунтово-кліматичних умов. Отже, виведення нових вітчизняних сортів картоплі, стійких до захворювань, є актуальним завданням на сьогоднішній день (Elansky et al., 2015; Vlokh, 2010; Шуста та ін., 2012; Новак, 2011; Чередниченко, 2012; Завірюха та ін., 2014, 2015; Воробйова, 2013).

Насьогодні існує багато проблем, пов'язаних із вирощуванням картоплі: недостатня кількість сортів, адаптованих до умов зростання, низька якість та ефективність аграрних технологій, невідповідні умови зберігання, транспортування та продажу, що призводить до зараження рослин та врожаю хворобами та враження шкідниками (Chuntale, 2018). Для вирішення цих проблем застосовують агротехнологічні та хімічні методи, а також селекцію на стійкість. Ці методи мають свої переваги, але основні недоліки даних підходів – кошовність хімікатів та обладнання для обробки рослин, забруднення навколишнього середовища, часозатратність процесу селекції (яка триває 15-20 років), набуття фітопатогенами стійкості до засобів хімічного захисту та втрата рослинами резистентності до хвороб (Halterman et al., 2016; Mullins et al., 2006; Xin et al., 2013; Jones et al., 2014; Chuntale, 2018).

Проблема створення нових сортів томатів, стійких до широкого спектру фітопатогенів, також є надзвичайно актуальною. У період з 2010 по 2014 рік було проаналізовано близько 10 000 сортів та гібридів томатів вітчизняної та зарубіжної селекції на стійкість до грибних патогенів, і більше, ніж 75.4% проаналізованих сортів були високочутливими до грибних хвороб (Шотик та ін., 2014).

Для контролю бактеріальних та грибних хвороб томатів та картоплі широко застосовують агротехнологічні, хімічні та біотехнологічні методи, селекцію на стійкість до хвороб (Glazebrook, 2005; Boddy, 2016; Argios, 2005; Kolomiets et al., 2019a).

Обмеженість хімічного захисту полягає у тому, що внаслідок неконтрольованого використання пестицидів та швидкої еволюції фітопатогенів хімічні речовини швидко втрачають активність (Elansky et al., 2015; Федорчук, 2017; Сергієнко, 2012; Бабаянц та ін., 2014; Michalska et al., 2016; Huang et al., 2005; Runno-Paurson et al., 2015).

Для селекції на стійкість до фітопатогенів використовують підходи маркер-асоційованої селекції, методи культивування у лабораторії, в польових та тепличних умовах (Fentik, 2017). За останні 20 років було ідентифіковано молекулярні маркери, асоційовані із генами стійкості до збудників бактеріальних хвороб томатів, а саме, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, бактерій роду *Xanthomonas*, *Ralstonia solanacearum*. Ці маркери зменшують тривалість процесу селекції за стійкістю до означених хвороб (Wang et al., 2018). Завдяки таким молекулярно-біологічним підходам, як аналіз зчеплення, “chromosome walking” та молекулярним маркерам, у геномі томату було картовано більш ніж 100 локусів, що містять гени стійкості до різних фітопатогенних мікроорганізмів (Ercolano et al., 2012). Однак, хоча сучасні досягнення молекулярної біології значно розширили можливості та полегшили процес селекції, селекція за певною ознакою досі лишається часозатратним процесом (Fentik, 2017).

Важливим джерелом генів стійкості до фітопатогенів є дикі види Пасльонових. У диких видах Solanaceae було ідентифіковано більше ніж 40 генів стійкості, з них близько 20 генів було перенесено у культурні сорти. Серед диких видів, найбільше генів стійкості було ідентифіковано у *S. chilense*, *S. peruvianum*, *S. habrahaides*, *S. pimpinellifolium* (Ercolano et al., 2012). Так, у рослинах томатів локус *Ve* містить 2 інвертовані гени *Ve1* та *Ve2*, що забезпечують стійкість до видів *Verticillium*. Ці гени кодують глікопротеїни, розміщені на поверхні клітин та містять сигнальні послідовності рецептор-опосередкованого ендоцитозу (Kawchuk et al., 2001). Або, наприклад, локус *ptr1* (*Pseudomonas tomato* race 1) був ідентифікований у *S. lycopersicoides*. Гени, розміщені в цьому локусі, забезпечують стійкість до штаму *Pseudomonas*

syringae pv. *tomato*, який несе авірулентний ген *AvrRpt2*, та *Ralstonia pseudosolanacearum*, що містить ген *RipBN*. У локусі *Ptr1* розміщені 8 генів, із них 2 кодують NS-LRR білки. Ортолог *Ptr1* у томатів (*L. esculentum*) – псевдоген, однак у картоплі у локусі *Ptr1* розміщено функціональний ген (Mazo-Molina et al., 2020).

Складність селекції цінних сортів томатів та картоплі на стійкість до різних фітопатогенів пов'язана з полігенною природою стійкості та зчепленням генів стійкості із небажаними ознаками (Xin et al., 2013; Huet, 2014; Boschi et al., 2017; Liedl et al., 2013). Так, у роботі (Xin et al., 2013) для забезпечення стійкості до фітофторозу було запропоновано створення сортів картоплі, поліморфних за R-генами. Оскільки при схрещуванні із дикими видами роду *Solanum*, окрім генів цільової ознаки, можливе перенесення зчеплених генів нецільових ознак, і для видалення пулу зчеплених генів необхідне зворотне схрещування із батьківським сортом, процес селекції може тривати десятки років. З огляду на це, створення сортів картоплі, поліморфних за R-генами, можливе за використання більш простого та ефективного методу цисгенезу, який дозволяє переносити гени корисних ознак із геномів диких видів *Solanum* у геноми промислово цінних сортів картоплі шляхом трансформації (Xin et al., 2013). Проте, серед диких видів родини Solanaceae не було виявлено генів стійкості до деяких фітопатогенів, наприклад, *C. michiganensis* та *R. solanacearum*. Однак, деякі дикі види Solanaceae, які здатні забезпечити толерантність до даної бактерії, широко використовують в селекції (Sen et al., 2013).

Перспективними методами контролю хвороб рослин є біологічні методи, такі як: 1) зараження авірулентними штамми фітопатогенів, 2) обробка рослинних культур препаратами на основі мікроорганізмів-антагоністів, що активують імунну відповідь рослин за механізмом ISR (індукована системна стійкість), таких як *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp., *Bacillus* sp. Перевагами біологічних методів контролю є: довготривалість стійкості та здатність до самопідтримки, самовідновлення та розповсюдження. Недоліками зазначених

біологічних методів контролю є непрогнозований вплив на хімічний та мікробіологічний склад ґрунтів (Kolomiets et al., 2019a; Fiers et al., 2012; Yuliar & Toyota, 2015, Циганкова та ін., 2012).

Альтернативним методом захисту рослин є використання методів генетичної інженерії. За використання даних методів можливе перенесення генів стійкості до фітопатогенів в геноми цінних сортів. За механізмами забезпечення стійкості до фітопатогенів, можна виділити три групи цільових генів: 1) гени авірулентності, 2) гени стійкості до бактеріальних фітотоксинів, 3) антимікробні пептиди рослинного, тваринного або бактеріального походження, які мають бактерицидну активність (Kolomiets et al., 2019a; Bruce, 2012; Ceasar & Ignacimuthu, 2012; Grant et al., 2013; Rommens & Kishore, 2000; Strange & Scott, 2005; Owen & Punja, 2010; Stefanova et al., 2008; Yemets et al., 2014; Lakshman et al., 2013, De Steur et al., 2019).

Антимікробні пептиди (АМП) – це невеликі молекули розміром 12-50 амінокислот, які широко представлені серед всіх живих організмів, включаючи PR (pathogenesis-related) білки рослин (Jung & Kang, 2014; López-García et al., 2012). Перший антимікробний пептид - граміцидин із ґрунтового штаму бактерії роду *Bacillus* sp., був описаний дослідниками Hotchkiss та Dubos у 1940. Також, одними із перших описаних антимікробних пептидів були дефензин та бомбінін із лейкоцитів та епітеліальних клітин кролів, та лактоферин із коров'ячого молока (Jung & Kang, 2014).

Рослинні PR білки – маленькі пептиди молекулярною масою 5-75 кДа, які були віднесені до 17 родин відповідно до їх активності. Приклади деяких PR білків – хітинази, глюканази, тауматин-подібні білки (TLPs), інгібітори протеїназ, пероксидази, рибонуклеазоподібні білки (RLPs), дефензини, тіоніни, білки-транспортери ліпідів (LTPs), оксалат оксидази (OXOs), і т.д. (Glazebrook, 2005; Boddy, 2016; Argios, 2005; López-García et al., 2012; Moosa et al., 2017).

Всі АМП, які експресуються у різних організмах, мають спільні властивості: це лужні, амфіпатичні, збагачені на цистеїн пептиди із жорсткою третинною структурою, стабілізованою дисульфідними зв'язками. В залежності

від структури, антимікробні білки розділяють на групи: 1) α -ланцюгові пептиди, 2) β -складчасті пептиди із двома або більше дисульфідними зв'язками, 3) пептиди із одним дисульфідним зв'язком та петлею, та 4) подовжені пептиди (Jung & Kang, 2014). Всі АМП специфічні до бактеріальних клітин, які відрізняються від еукаріотичних негативно зарядженими фосфоліпідами на зовнішньоклітинній поверхні (Jung & Kang, 2014; López-García et al., 2012). Механізм антимікробної дії АМП залежить від їх структури. Більшість α -ланцюгових пептидів руйнують бактеріальні клітини шляхом формування килимоподібних кластерів або пучків бочкоподібних пор. β -складчасті пептиди, зазвичай, вбудовуються в ліпідну мембрану та формують тороїдальні пори (Jung & Kang, 2014). Деякі антимікробні пептиди, такі як рослинні дефензини, як і антибіотики, інгібують активність ферментів, що приймають участь у білковому синтезі в клітинах патогенів (Jung & Kang, 2014).

Іншою стратегією підвищення стійкості рослин до фітопатогенів, зокрема, до рослинних вірусів, за використання методів генетичної інженерії є інтродукція та експресія генів рибозимів, неструктурних білків, білків оболонки, антисенс-РНК. Стійкість забезпечується шляхом зупинки процесу інфікування на ранніх етапах за механізмом сайленсинга експресії генів вірусу. При цьому, низький рівень експресії вірусних неструктурних білків в геномі трансгенних рослин також призводить до сайленсингу генів вірусу (Davies, 2000; Chakravarty et al., 2007). Із застосуванням технології РНК інтерференції (RNAi) було показано можливість підвищення стійкості картоплі до вірусних хвороб шляхом сайленсингу синтезу білків оболонки таких вірусів, як PVY, PLRV, PVX, PVS, а також стійкість до комах шкідників шляхом сайленсингу генів їх β -актину, в результаті чого комахи гинули на етапі розвитку личинки (Nameed et al., 2018).

Для підвищення стійкості до фітопатогенів також широко використовують гени рослинних гідролітичних ферментів β -глюканаз та хітиназ, що відносяться, відповідно, до родин PR-2 та PR-3. Ці ферменти руйнують клітинну стінку, що перешкоджає росту гіфів та їх проникненню до

рослинних тканин. Хітинази також руйнують клітинну стінку. Так, наприклад, у роботі (Dolatabadi et al., 2014) було проведено *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію томату сорту Sheffelat трьома генами (хітинази, глюканази та PR-1) для підвищення стійкості трансгенних рослин до *F. oxysporum f.sp. lycopersici*. Ефективність трансформації була на рівні 2,7%. В даній роботі було показано, що зразки тотального білка трансгенних рослин інгібують ріст конідій гриба *F. oxysporum f.sp. lycopersici* в умовах *in vitro*. Експресія трансгенів, окрім незначного підвищення вмісту хлорофілу *a* та *b* в порівнянні із контролем, не змінила морфологію трансгенних рослин (Dolatabadi et al., 2014). Інший ген, який використовували для підвищення стійкості томатів до фітопатогенів – це ген гевейн-подібного білка (віднесений до групи PR-4). Цей білок здатен зв'язувати хітин, в результаті чого змінюється морфологія гіфів, що перешкоджає їх росту та розвитку (Khaliluev & Shpakovskii, 2013). Використання тауматин-подібних білків, що належать до групи PR-5, для підвищення стійкості томатів до фітопатогенів також є перспективним, оскільки ці білки підвищують проникність клітинних стінок патогенів. Ці білки мають β -1,3-глюканазну активність, інгібують α -амілазу комах та трипсин тварин (Khaliluev & Shpakovskii, 2013). Для захисту томатів також активно використовують гени дефензинів. Фунгіцидна активність дефензинів полягає в індукції утворення ROS, які пошкоджують клітинні мембрани грибів, пошкодженні регуляції клітинного циклу патогенів, блокуванні їх Ca^{2+} та Na^{+} -каналів (Khaliluev & Shpakovskii, 2013). Інший підхід до підвищення стійкості томатів до фітопатогенів полягає у використанні R-генів, продукти яких інгібують токсини фітопатогенів, активують системи захисту рослин (наприклад, лігніфікацію клітинних стінок), індують реакції гіперчутливості (HR) (Glazebrook, 2005; Boddy, 2016; Argios, 2005; Khaliluev & Shpakovskii, 2013). Також, для захисту томатів від патогенів використовують модифікації метаболічних шляхів для синтезу захисних речовин, наприклад, стильбенів у плодах томатів (Khaliluev & Shpakovskii, 2013).

Оскільки рослинні патогени здатні долати механізм стійкості “ген-проти-гена”, ефективною стратегією для підвищення стійкості культурних рослин до фітопатогенів є трансформація рослин генами, що кодують АМП нерослинного походження, які мають антимікробну активність проти великої кількості патогенних мікроорганізмів (Dahleen et al., 2001, Marcos et al., 2008, Osusky et al., 2000, Patil et al., 2012). Прикладами таких білків є α -ланцюгові церкопіни Лускокрилих, магаїніни тропічних амфібій, β -складчасті дефензини або протегрїни, лінійний мелітин із бджолиного яду, etc. Однак, деякі АМП можуть бути токсичними для потенційних споживачів, як, наприклад, церкопіни, що мають гемолітичну активність (Marcos et al., 2008, Osusky et al., 2000). Приклади тваринних та грибних генів, які використовують для захисту томатів від патогенів, є гени магаїнінів, церкопінів, дефензинів, хітинах, лактоферину, та ін. (Khaliluev & Shpakovskii, 2013). Потенційно безпечним для здоров'я людини антимікробним білком є лактоферин. Завдяки багатьом корисним властивостям, лактоферин є перспективним геном інтересу для експресії у геномах культурних рослин (Dahleen et al., 2001; Ali et al., 2018).

1.7. Структура та антимікробна активність лактоферину

За останні 20 років було показано велику кількість корисних властивостей молочних білків та гідролізатів – антимікробна, фунгіцидна, антитромботична, імуномодуляторна, протівірусна, протизапальна, і т.д. (Adleranova et al., 2008, Giansanti et al., 2016). Фізико-хімічні характеристики та біологічна активність молочних білків та пептидів, таких як лактоальбумін, лактоглобулін та лактоферин описані в базі даних MilkAMP (Bruni et al., 2016).

Лактоферин – глікопротеїн ссавців із сильною антимікробною активністю, який здатний зв'язувати йони заліза та відіграє важливу роль в неспецифічному імунитеті. Це лужний білок із ізоелектричною точкою $pI=8.7$. Поліпептидний ланцюг лактоферину складається із приблизно 700 амінокислот (711 – лактоферин людини, 689 – бичачий лактоферин). Білок складається із 2

гомологічних субодиниць, з'єднаних гнучким α -ланцюгом, кожна субодиниця складається із 2 долей (N1, C1, N2, C2) (Adleranova et al., 2008, Giansanti et al., 2016). В кожній субодиниці лактоферину міститься один ферум-зв'язуючий центр, в якому зв'язуються йони Fe^{2+} та Fe^{3+} в присутності двох йонів CO_3^{2-} або HCO_3^- . Протонація міжмоментних водневих зв'язків призводить до дисоціації комплексу Fe-лактоферин. На відміну від трансферину, лактоферин здатний утримувати йони заліза при рН нижче 4.5, і спорідненість лактоферину до йонів Fe^{2+} та Fe^{3+} за низьких значень рН у 300 разів сильніша, ніж у трансферинів (Abdallah et al., 2000). Така властивість є важливою у місцях запалення, в яких лактоферин сильно зв'язує залізо та утримує його, перешкоджаючи поглинання заліза патогенними бактеріями (Adleranova et al., 2008).

Молекулярна маса лактоферину (Lf) становить від 76 до 80 кДа. Така різниця молекулярної маси залежить від рівня глікозилювання білка. Лактоферин має 3 сайти глікозилювання по залишкам Asn138, Asn479 та Asn624, відповідно. Два перших сайти N-глікозилювання, звичайно, несуть складні N-глікани, в той час як третій залишок (Asn624), в основному, неглікозилюваний (Spik et al., 1982).

Лактоферин здатний зв'язувати не лише залізо, але й інші йони металів - Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , etc (Adleranova et al., 2008, Giansanti et al., 2016). Спорідненість до інших йонів металів значно нижча, ніж до Fe^{3+} , але здатність взаємодіяти із ними впливає на структуру, функції та конформацію лактоферина. Наприклад, спорідненість лактоферину до заліза підвищується у присутності Zn^{2+} та Cu^{2+} (Hakkansson et al., 1995); в присутності 10 мМ CaCl_2 лактоферин формує тетраметри (Bennett et al., 1981). Окрім йонів металів лактоферин може зв'язуватись із різними органічними молекулами – ліпополісахаридами, гепарином, глікозаміногліканами, і т.д. (Adleranova et al., 2008, Giansanti et al., 2016).

На сьогоднішній день велика кількість робіт присвячена дослідженням антимікробної активності лактоферина та пептидів, отриманих на основі лактоферина. Так як не лише інтактна молекула лактоферину, але і його

невеликі фрагменти володіють антимікробною активністю, можна зробити висновок, що антимікробні властивості лактоферину залежать від його здатності зв'язувати залізо та від особливостей структури пептидів, похідних лактоферину. Серед різноманітних пептидів, отриманих із лактоферину, антимікробна активність була підтверджена лише для трьох: Lf(1-11), лактоферицину та лактоферампіну. Всі ці пептидні фрагменти розміщені в N-кінці молекули лактоферину і мають сильнішу антимікробну активність, ніж інтактна молекула Lf (Bruni et al., 2016; Giansanti et al., 2016; Sinha et al., 2013).

Lf(1-11) – основний пептид, який складається із послідовності з 1 по 11 N-кінцевих амінокислотних залишків лактоферину. Lf(1-11) людини (GRRRSVQWCAV) – лужний пептид, збагачений на аргінін, який містить високоваріабельну петлю та коротку β -складчасту послідовність, а отже, може бути віднесений до третьої групи антимікробних пептидів. Антимікробна активність Lf(1-11) пов'язана з руйнуванням клітинних та/або мітохондріальних мембран бактеріальних та грибних патогенів завдяки наявності гідрофобних залишків валіна (V6) та триптофана (W8) та внаслідок лужної природи пептида (Bruni et al., 2016; Giansanti et al., 2016; Sinha et al., 2013).

Лактоферампін (Lfampin) – інший пептид, який складається із 16 залишків (268-284) домена N1 лактоферина. Як і Lf(1-11), лактоферампін має гідрофобний домен та є позитивно зарядженим. Lfampin належить до антимікробних пептидів першої групи, так як він має α -ланцюгову послідовність, яка відіграє важливу роль у мембрано-асоційованій активності Lf (Bruni et al., 2016; Giansanti et al., 2016; Sinha et al., 2013).

Лактоферицин людини (Lfcin) – найбільш довгий біологічно активний пептид, який складається із 47 амінокислот (1-47) лактоферину. Даний пептид отримують шляхом розщеплення лактоферину за використання пепсина. Бичачий лактоферицин більш короткий і розміщений більш дистально (17-41), однак має більш високу бактерицидну активність у порівнянні з лактоферином людини. Обидва лактоферицини належать до третьої групи антимікробних

пептидів, оскільки вони позитивно заряджені; обидва пептиди мають петлю розміром в 18 амінокислот та гідрофобні амінокислотні залишки. Механізм антибактеріальної дії лактоферицина подібний до такого у лактоферампіна та асоціюється із руйнуванням клітинних мембран мікроорганізмів (Bruni et al., 2016; Giansanti et al., 2016; Sinha et al., 2013).

Антибактеріальну активність лактоферина та олігопептидів, отриманих із лактоферину, було підтверджено по відношенню до великої кількості бактеріальних патогенів людини, тварин та рослин (Bruni et al., 2016; Lakshman et al., 2013; Stefanova et al., 2008; Yemets et al., 2014).

Було проведено також декілька досліджень щодо фунгіцидної активності лактоферина та пептидів, отриманих із лактоферина, проти фітопатогенних грибів. У роботі (Munoz et al., 2006) було показано фунгістатичну та бактерицидну активність бичачих лактоферицинів (17-31) та (20-25) в умовах *in vitro* та *in vivo* проти великої кількості грибних патогенів рослин: *Fusarium oxysporum*, який спричиняє бактеріальне в'янення томатів, *Botrytis cinerea*, який є збудником сірої плісняви, проти збудника пірикуляріоза рису *Magnaporthe grisea*; а також збудників, що заражають рослинні культури після їх збирання: *Penicillium italicum* та *P. digitatum*, які інфікують плоди цитрусових, та *Penicillium expansum*, що інфікує яблука; *Alternaria* sp. – гриба, резистентного до широко застосованих фунгіцидів, а також проти модельного міцеліального гриба *Aspergillus nidulans*. Фунгістатична активність лактоферицинів проявлялась в інгібуванні росту міцелію, збільшенні проникності клітинних стінок та плазматичної мембрани гіфів, але не конідій. В іншій роботі (Lahoz et al., 2008) було досліджено фунгістатичну активність бичачого аполактоферина, не зв'язаного із залізом (*bLf*), проти 11 фітопатогенних видів грибів: *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani*, *Gliocladium roseum*, *Penicillium expansum*, *Phoma exigua*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* та *Trichoderma viride*. В результаті даного дослідження було встановлено інгібування росту міцелію більшості досліджених видів в умовах *in vitro*, окрім *A. alternata*, *G. roseum*, *F. solani* та *C.*

lindemuthianum. Автори висувають припущення, що нечутливість до лактоферина даних 4 видів може бути обумовлена тим, що їх сидерофори можуть мати більш сильну спорідненість до Fe^{3+} , ніж bLf, або тим, що концентрація Fe^{3+} у середовищі була достатньою для їх росту.

Отже, механізм антибактеріальної та фунгістатичної активності лактоферину та його пептидів здійснюється шляхом дестабілізації клітинних мембран, при цьому зв'язування йонів заліза відіграє вторинну роль (Fernandes & Carter, 2017).

Антивірусну активність лактоферину було продемонстровано по відношенню до великої кількості вірусних інфекцій людини (Berlutti et al., 2011, Wakabayashi et al., 2014) та деяких вірусів рослин, таких як вірус пожовтіння та згортання листя томатів (TYLCV) (Abdelbacki et al., 2010). Противірусна активність лактоферину здійснюється шляхом зв'язування із гепаринсульфатними та глікозаміноглікановими рецепторами вірусів або із всією вірусними частинками, що перешкоджає проникненню в клітини господаря.

Таким чином, використання гена лактоферину для підвищення стійкості трансгенних рослин до хвороб може підвищити ефективність природних захисних механізмів рослин шляхом зв'язування заліза та шляхом прямого руйнування клітин патогенів. Важливо зазначити, що трансфериноподібні (TF-like) білки слабо представлені серед рослин. А саме, гени трансфериноподібних білків були виявлені лише в деяких видах Chlorophyta (*Chlorella variabilis*), Pteridophyta (*Selaginella moellendorffii*) та Angiospermae (*Glycine max*, *Theobroma cacao*, *Medicago truncatula* та *Citrus clementina*) (Lina et al., 2016). Однак, в 2013 році лактоферин був виявлений в насінні *Syzygium cumini* (Binita et al., 2014).

1.8. Трансгенні рослини, що експресують гени лактоферину

Протягом останніх 20 років було проведено ряд досліджень, спрямованих на отримання деяких видів рослин, що експресують гени лактоферину, пептидів, отриманих із лактоферину та синтетичних химерних пептидів. Зокрема, генами лактоферину було трансформовано такі види рослин, як люцерна (*Medicago sativa*) (Stefanova et al., 2013a), мікроскопічні водорості (*Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardtii*) (Koo et al., 2013, Pang et al., 2019), *Arabidopsis thaliana* (Nguyen et al., 2011), ячмінь (*Hordeum vulgare*) (Kameranova et al., 2008, Tanasienko et al., 2011), женьшень (*Panax ginseng* and *Acanthopanax senticosus*) (Jo et al., 2006, Kwon et al., 2003), кукурудза (*Zea mays*) (Samyn-Petit et al., 2001), груша (*Pyrus communis*) (Malnoy et al., 2003), картопля (*Solanum tuberosum*) (Buziashvili et al., 2020a, Chong et al., 2000), рис (*Oryza sativa*) (Bethel et al. 2004, Huang et al., 2008, Humpfrey et al., 2002, Franco, 2012; Funakoshi et al., 2017, Lee et al., 2010a, 2010b, Nandi et al., 2002, 2005, Rachmawati et al., 2005, 2014, Suzuki et al., 2003, Takase et al., 2005, Yi et al., 2018), батат (*Ipomoea batatas*) (Min et al., 2006), тютюн (*Nicotiana tabacum* та *N. benthamiana*) (Chahardoli et al., 2017, 2018, Fukuta et al., 2012, Kumar et al., 2012, Li et al., 2004, Mitra et al., 1994, Salmon et al., 1998, Samyn-Petit et al., 2003, Sohrabi et al., 2014, Spik et al., 2000, Zhang et al., 1998), томат (*Lycopersicon esculentum*) (Buziashvili et al., 2020b, Lee et al., 2002) та пшениця (*Triticum aestivum*) (Han et al., 2012).

Трансформацію рослинних культур генами лактоферину та похідних від лактоферину пептидів проводили з метою: 1) підвищення стійкості рослин до фітопатогенів (Chahardoli et al., 2018, Fukuta et al., 2012, Han et al., 2012, Lee et al., 2002, Li et al., 2004, Malnoy et al., 2003, Mitra et al., 1994, Nguyen et al., 2011, Stefanova et al., 2013a, Takase et al., 2005, Zhang et al., 1998), 2) подальшого використання трансгенних рослин як корму для худоби та птахів для покращення їх здоров'я та росту (Humpfrey et al., 2003, Lee et al., 2010b, Stefanova et al., 2013a), 3) використання трансгенних рослин як біофабрик для

синтезу рекомбінантного лактоферину (Chahardoli et al., 2017, Funakoshi et al., 2017, Jo et al., 2006, Huang et al., 2008, Koo et al., 2013, Kwon et al., 2003, Lee et al., 2010a, Min et al., 2006, Nandi et al., 2002, Pang et al., 2019, Rachmawati et al., 2005, 2014, Suzuki et al., 2003), 4) прямого використання у їжу функціоналізованих продуктів харчування, отриманих із трансгенних рослин (Bethell et al., 2004, Chong et al., 2000, Funakoshi et al., 2017, Han et al., 2012, Huang et al., 2008, Kameranova et al., 2007, Lee et al., 2010a, Nandi et al., 2002, 2005, Rachmawati et al., 2005, 2014, Suzuki et al., 2003, Tanasienko et al., 2011), 5) підвищення якості зернових культур за рахунок експресії лактоферину шляхом зниження рівнів контамінації зерна продуктами життєдіяльності фітопатогенних грибів (Bethell et al., 2004, Funakoshi et al., 2017, Han et al., 2012, Huang et al., 2008, Kameranova et al., 2007, Lee et al., 2010a, Nandi et al., 2002, 2005, Rachmawati et al., 2005, 2014, Suzuki et al., 2003, Tanasienko et al., 2011), 6) дослідження біохімічних властивостей та біологічної активності рекомбінантного лактоферина та пептидів, отриманих з лактоферина (Chahardoli et al., 2017, 2018, Franco et al., 2012, Fukuta et al., 2012, Funakoshi et al., 2017, Huang et al., 2008, Jo et al., 2006, Koo et al., 2013, Kumar et al., 2012, Lee et al., 2010b, Mitra et al., 1994, Nandi et al., 2002, 2005, Salmon et al., 1998, Samyut-Petit et al., 2001, 2003, Sohrabi et al., 2014, Spik et al., 2000, Suzuki et al., 2003, Yi et al., 2018, Zhang et al., 1998).

Крім того, було опубліковано декілька досліджень, в яких було показано ефективність зовнішньої обробки рослин лактоферином для їх захисту від хвороб, і такий підхід був більш ефективним, ніж використання контактних фунгіцидів (Abdelbacki et al., 2010, Crisp et al., 2006, Nunez et al., 2018, Panea et al., 2012, Taha et al., 2015).

В роботах, присвячених дослідженню стійкості до фітопатогенів трансгенних рослин, що несуть гени лактоферину, було показано, що експресія даного білка підвищує їх стійкість до бактеріальних, грибних та вірусних патогенів (Табл. 1.1). Так, у 1994 році авторами Mitra & Zhang було опубліковано перше дослідження, присвячене генетичній трансформації

тютюну геном лактоферину людини. В даній роботі було отримано калюс тютюну, в клітинах якого було підтверджено експресію гена *hLf*, що знаходився під контролем CaMV 35S промотора. При цьому з клітин калюсу було виділено як повнорозмірний білок масою 70 кДа, так і вкорочений масою 48 кДа. Антибактеріальну активність фракції тотального білка із трансгенного калюсу було підтверджено по відношенню до *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseoli*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Ralstonia solanacearum* (Mitra & Zhang, 1994). У 1998 р. тими же авторами було опубліковано роботу, в якій було показано часткову стійкість трансгенних ліній тютюну до *Ralstonia solanacearum* (Zhang et al., 1998). Наступною була опублікована робота із трансформації томату сорту F7926-96 геном лактоферину людини (Lee et al., 2002), де було показано часткову стійкість трансгенних ліній томатів до *R. solanacearum*. У 2003 р. авторами Malnoy et al. (Malnoy et al., 2003) було повідомлено про трансформацію груші сорту Passe Crassane геном бичачого лактоферину та показано підвищення її стійкості до бактеріальних патогенів *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*. У 2005 р. Takase et al. (Takase et al., 2005) опублікували результати дослідження із генетичної трансформації рису сорту Nirponbare геном лактоферину людини (*hLf*) та геном N-ділянки лактоферину людини (*hLfN*). Підвищення стійкості отриманих трансгенних ліній рису було підтверджено до фітопатогенних бактерії *Pseudomonas plantarii*, гриба *Pyricularia oryza*, однак трансгенні лінії виявилися нестійкими до вірусу карликовості рису. Також було опубліковано декілька робіт із трансформації рослин тютюну, арабідопсису, пшениці та люцерни генами лактоферину, лактоферицину та злитого гена лактоферицину та лактоферампіну (Nguyen et al., 2011; Fukuta et al., 2012; Chahardoli et al., 2018). Так, автори Nguyen et al. (Nguyen et al., 2011) показали підвищення стійкості трансгенних рослин тютюну (*Nicotiana benthamiana*) та *Arabidopsis thaliana* до фітопатогенного гриба *Rhizoctonia solani*. В роботі (Fukuta et al., 2012) було продемонстровано

підвищення стійкості тютюну, трансформованого геном бичачого лактоферицину, до *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* та *Botrytis cinerea*, а в

Таблиця 1.1

Дослідження по трансформації рослин генами лактоферину чи його фрагментами для підвищення стійкості до фітопатогенів

Рослина	Ген	Стійкість до фітопатогенів	Посилання
Люцерна	лактоферин людини (<i>hLf</i>)	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> , <i>Clavibacter michiganensis</i>	Stefanova et al., 2013
Арабідопсис Таля	бичачий лактоферин (<i>bLf</i>)	<i>Rhizoctonia solani</i>	Nguyen et al., 2011.
Груша сорт Passe Crassane	бичачий лактоферин (<i>bLf</i>)	<i>Erwinia amylovora</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Malnoy et al., 2003.
Томат сорт F7926-96	лактоферин людини (<i>hLf</i>)	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Lee et al., 2002.
Пшениця сорт Bobwhite	бичачий лактоферин (<i>bLf</i>)	<i>Fusarium graminearum</i>	Han et al., 2012.
Тютюн	лактоферин людини (<i>hLf</i>)	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseoli</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> , <i>Ralstonia solanacearum</i>	Mitra & Zhang, 1994.
Тютюн	лактоферин людини (<i>hLf</i>)	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Zhang et al., 1998.
Тютюн	бичачий лактоферин (<i>bLf</i>)	<i>Rhizoctonia solani</i>	Nguyen et al., 2011.
Тютюн	бичачий лактоферицин (<i>bLfcin</i>)	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> , <i>Botrytis cinerea</i>	Fukuta et al., 2012.
Тютюн	злитий ген лактоферицину та лактоферампіну (<i>hLfchimera</i>)	<i>Erwinia amylovora</i> , <i>Ralstonia solanacearum</i>	Chahardoli et al., 2018.
Рис сорт Nipponbare	лактоферин людини (<i>hLf</i>), ген N-долі лактоферину людини (<i>hLfN</i>)	<i>Pseudomonas plantarii</i> , <i>Pyricularia oryza</i> , <i>Bipys карликовості рису</i>	Takase et al., 2005.

(Chahardoli et al., 2018) – стійкість тютюну, що експресує злитий ген людського лактоферицину та лактоферампіну (*hLfchimera*), до *Erwinia amylovora* та *Ralstonia solanacearum*. В 2012 р. опубліковано працю, в якій було показано

підвищення стійкості трансгенної пшениці, що експресує бичачий лактоферин, до *Fusarium graminearum* (Han et al., 2012), і, нарешті, в 2013 р. було показано підвищення стійкості трансгенної люцерни, трансформованої геном лактоферину людини, до бактерій *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* та *Clavibacter michiganensis* (Stefanova et al., 2013a).

В декількох статтях висвітлено переваги та недоліки експресії лактоферину в рослинних культурах. Серед аргументів “проти” автори (Freese et al., 2005, 2007) зазначають можливість потрапляння трансгена в природні екосистеми, складність контролю та розповсюдження трансгенних рослин, можливості контамінації трансгенним насінням сертифікованого зерна, негативного впливу лактоферину, який експресується в рослинах, на ґрунтовий мікробіом та на здоров’я людини, але наразі немає підтверджень зазначених негативних ефектів. Позитивні ефекти експресії лактоферину в трансгенних рослинах описані у багатьох дослідженнях – його антибактеріальна, противірусна та фунгіцидна активність проти патогенів рослин, тварин та людини, добра засвоюваність та низька алергенність рекомбінантного білка, його імуноодулююча та антиоксидантна активність. Однак, підвищена експресія лактоферину може негативно впливати на метаболізм заліза в рослинах, що може призвести до залізодефіциту та затримки їх росту (Kumar et al., 2012; Malnoy et al., 2003; Stefanova et al., 2013b; Takase et al., 2005). Крім того, було показано відмінність паттернів глікозилювання лактоферину, отриманого із трансгенних рослин, та нативного лактоферину. Зокрема, виявлено, що у рекомбінантного лактоферину, отриманого із рослин, наявні залишки ксилози та фукози, які є типовими для рослин. Проблему залізодефіциту, спричиненого експресією лактоферину, можливо вирішити шляхом використання генно-інженерних підходів, наприклад, за рахунок застосування рослинних тканино- та органоспецифічних промоторів та злиття гена лактоферину із сигнальними пептидами, що відповідають за експресію лактоферину у плодах та насінні, або за підвищення експресії за специфічних умов, таких як РТІ (pathogen-triggered immunity) (Chong & Langridge, 2000,

Fukuta et al., 2012, Funakoshi et al., 2017, Han et al., 2012, Jo et al., 2006, Kameranova et al., 2007, Kwon et al., 2003; Lee et al., 2010a, Nandi et al., 2002, Rachmavati et al., 2005, Samyn-Petit et al., 2001, 2003, Tanasienko et al., 2011). Проблему відмінності паттернів глікозилювання рекомбінантного та нативного лактоферину можливо вирішити за допомогою генетичної модифікації генів, що регулюють каскад глікозилювання у рослин – шляхом зниження експресії фукозилтрансфераз та перенесення генів галактозилтрансфераз ссавців у геном рослин (Chahardoli et al., 2017, 2018, Franco et al., 2012, Jo et al., 2006, Nandi et al., 2002, Salmon et al., 1998, Samyn-Petit et al., 2001, 2003, Sohrabi et al., 2014, Spik et al., 2000, Suzuki et al., 2003).

Отже, експресія лактоферину в геномах рослин має позитивний вплив на здоров'я людини, оскільки лактоферин підвищує якість врожаю та має імуномодуляторну активність (Conesa et al., 2010, Gharelo et al., 2016, Greiner, 2007, Heinemann et al., 2009, Lakshman et al., 2013, Stefanova et al., 2008, Wang et al., 2017, Yemets et al., 2014).

Враховуючи важливість томатів та картоплі як сільськогосподарських культур, актуальним є створення ліній *S. tuberosum*, стійких до небезпечних фітопатогенів бактеріальної природи, таких як *R. solanacearum* (що спричиняє буру гниль бульб) та *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (збудника кільцевої гнилі бульб картоплі), а також до таких агресивних фітопатогенних грибів, як *P. infestans* (збудника фітофторозу) та *F. sambucinum* (збудника сухої гнилі бульб картоплі). Не менш актуальним є створення ліній *L. esculentum*, стійких до небезпечних бактеріальних та грибних хвороб, зокрема, до бактеріального раку томатів, збудником якого є *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, бактеріального в'янення томатів, збудником якого є *R. solanacearum*, та фітофторозу, збудником якого є *P. infestans*, тощо. Одним із перспективних підходів щодо підвищення стійкості культурних рослин до зазначених фітопатогенів є використання методів генетичної інженерії, зокрема, трансформації рослин геном лактоферину людини. Саме на виконання цього завдання і була спрямована дана робота.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Рослинний матеріал, культури бактерій та грибів, використані в роботі

В роботі було використано асептичні рослини картоплі сортів картоплі Вернісаж, Левада, Світанок Київський та Зарево, люб'язно надані Інститутом картоплярства НААН України.

Сорт Вернісаж - середньостиглий (період досягання 120-126 днів), столового призначення, вміст крохмалю – середній (15,6-16,7%), бульби овальної форми, масою 76-82,3 г. Здатність до зберігання – висока (<http://sort.sops.gov.ua/cultivar/view/12492>).

Сорт Зарево – середньоранній сорт (період досягання – 115-120 діб), технічного призначення. Вміст крохмалю – 19-24%. Бульби округлої форми, масою 70-80 г, характерна висока лежкість (Остренко та ін., 2012; Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні на 2020).

Сорт Світанок Київський – ранньостиглий (період досягання – 85-105 днів), універсального призначення (вміст крохмалю 18-19%), маса бульб 90-120 г (Остренко та ін., 2012; Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні на 2020).

Сорт Левада – ранньостиглий (досягання за 95-100 днів), столового призначення (вміст крохмалю 16-19%), бульби кругло-овальної форми масою 90-105 г, висока лежкість та смакові якості (<http://sort.sops.gov.ua/cultivar/view/12060>).

Зазначені сорти характеризуються помірною чутливістю до деяких грибних хвороб, а саме, до фітофторозу (збудник – *P. infestans*), альтернаріозу (*Alternaria* sp.), фузаріозу (*Fusarium* sp), та до бактеріальних хвороб (бурої та кільцевої гнилі, збудниками яких є *R. solanacearum* та *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*) (Чередниченко, 2012, 2013, Строяновський, 2016, Vlokh, 2010;

Шуста та ін., 2012; Завірюха та ін., 2014, 2015; Воробйова, 2013; Podhaietskyi et al., 2018; Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні на 2020; Литвак та Левченко, 2002; Douches et al., 1997; Bisognin et al., 2002; Мельничук та ін., 2014).

Також, в роботі використовували томати сортів Money Maker та два українські сорти Лагідний та Перлина.

Money Maker – індетермінантний високоврожайний середньоранній сорт із періодом досягання 90-110 днів. Висота куща 1,5-1,8 м. Утворює 7-8 кистей із 8-10 плодами. Плоди округлі, гладенькі, червоні, щільні, рівні, масою 90-120 г (<https://topcombi.org/2737616-characterization-and-description-of-tomato-varieties-moneymaker-yield-and-cultivation>).

Сорт Лагідний – детермінантний, високоврожайний, ранньостиглий (період досягання 90-100 днів). Кущ прямостоячий, висотою 50-60 см. Плоди сливоподібні, гладенькі, червоні, масою 50-80 г. Даний сорт томату української селекції є сортом-стандартом по врожайності та вмісту поживних речовин (Мазоренко та Мазнеєв, 2011).

Сорт Перлина – індетермінантний, ранньостиглий (період досягання 60-65 днів). Кущ висотою 2-2,5 м, необхідна підпора і обов'язкове пасинкування. Плоди округлі, гладенькі, ребристі, темно-рожеві, м'ясисті, соковиті, солодкі, масою 200-300 г (Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні на 2020, http://oranjereya.com.ua/semena/product_info.php?products_id=515).

Зазначені сорти є чутливими до фітофторозу, Money Maker – до бактеріального в'янення (спричиненого *R. solanacearum*) та бактеріального раку (збудник – *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*) (Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні на 2020; Терьохіна, 2012; Яновський та ін., 2013; Люта та Кобиліна, 2014; Akhtar et al., 2016).

Насіння томату сорту Лагідний замовляли на сайті semena.in.ua, сорту Money Maker – на сайті semena.biz.ua, сорту Перлина – на сайті semena.cc

Для проведення біотестів використовували штами бактерій *R. solanacearum* ATCC 11696 (Yabuuchi et al., 1992), *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* Ac-1996, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* Ac-1995, та гриба *F. sambucinum* F-52211 (Подгорский и др., 2007) із колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології Національної академії наук України. Ізолят *P. infestans* високовірулентної раси 1.2.3.4.5.6.6+0.7.8.9.10.11 хуз (Ткачик, 2014) було люб'язно надано Інститутом картоплярства Національної академії аграрних наук України

2.2. Характеристика реактивів, використаних в роботі

В роботі використовували реактиви виробництва компаній:

1. “Sigma-Aldrich” (США): 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота (2,4-Д), тіамін-НСІ (вітамін В1), піридоксин-НСІ (вітамін В6), нікотинова кислота (вітамін РР), гліцин, міо-інозитол, дріжджовий екстракт, бактотриптон, 6-бензиламінопурин (БАП), нафтилоцтова кислота (НОК), індоліл-оцтова кислота (ІОК), зеатин, диметилсульфоксид (ДМСО), ЦТАБ, агароза, Трис-НСІ, бичачий лактоферин (L9507), вторинні анти-кролячі козячі антитіла, кон'югованими із пероксидазою хрону (A4914), суміш інгібіторів протеаз (P9599), дНТФ.
2. “Fermentas” (Литва): Таq-полімераза, 5x буфер для Таq-полімерази
3. “Amersham” (Великобританія): нейлоновий фільтр Nubond-NX.
4. “Merck” (Німеччина): мікробіологічний агар.
5. “Merck Millipore” (США) первинні кролячі антитіла до лактоферину
6. “Dushefa” (Нідерланди): ЕДТА, додецилсульфат натрію (ДСН), NaOH, КОН, Н₃ВО₃, ацетат калію.
7. “POCH” (Польща): магній сірчаноокислий семиводневий (MgSO₄×7H₂O), цинк сірчаноокислий семиводневий (ZnSO₄×7H₂O).

8. Макрохім” (Україна): амоній азотнокислий (NH_4NO_3), мідь сірчанооксида п’ятиводна ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$).
9. “Симбіас” (Україна): калій йодистий (KI).
10. ООО “Реактив” (Україна): залізо сірчаноокисле семиводне ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$).
11. “Біофарма” (Україна): хлорид натрію (NaCl).
12. “Хіммед” (Україна): калій азотнокислий (KNO_3), кальцій хлористий (CaCl_2), калій фосфорнокислий однозаміщений (KH_2PO_4), натрій молібденовокислий ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), борна кислота (H_3BO_3), марганець сірчанокислий п’ятиводневий ($\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$), кобальт хлористий шестиводневий ($\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$).
13. ЗАТ Фармацевтична фірма "Дарниця" – цефатоксим, рифампіцин, канаміцин.

Усі інші реактиви, які використовували в дослідженнях, були вироблені в країнах СНД і мали кваліфікацію ч.д.а. і о.с.ч.

2.3. Особливості культивування *in vitro* рослинних об’єктів

Асептичні рослини картоплі сортів Вернісаж, Світанок Київський, Левада та Зарево мікроклонально розмножували *in vitro* в 20 см пробірках на середовищі МСК, яке містило 4.3 г/л макро- та мікросолей МС (Murashige & Skoog, 1962), 5 г/л сахарози, 0.8 мг/л піридоксину, 2 мг/л тіаміну, 8 г/л агару, 5.7 г/л агару, рН 5.7 (Жук та ін., 2009; Бузіашвілі, 2018, 2019). Для цього, ізолювали ділянки стебла довжиною 2-3 см із 2-3 пазушними бруньками та переносили у пробірки із свіжим середовищем. Мікроклональне розмноження здійснювали 1 раз на місяць по мірі росту рослин.

Для отримання асептичної культури томатів, насіння стерилізували за методикою, описаною у (Танасієнко та ін., 2014): 2-3 хв у 70% етанолі та 15 хв у 5% гіпохлориті натрію (NaOCl), тричі відмивали по 10 хв у стерильній дистильованій воді та висаджували по 50-70 насінин на 1 чашку Петрі (d=9 см)

із базовим живильним середовищем МС, адаптованим для культивування томатів (МСТ), що містило 4.3 г/л макро- та мікросолей МС (Murashige & Skoog, 1962), 30 г/л сахарози, 0,5 мг/л піридоксину, 0,5 мг/л нікотинової кислоти, 1 мг/л тіаміну, 2 мг/л гліцину, 100 мг/л міо-інозиту, 8 г/л агару, рН 5.7.

Для пророщування насіння, чашки Петрі культивували протягом 10-12 діб при розсіяному світлі, температурі 24°C, інтенсивності освітлення 1,5-2 клк, світловому фотоперіоді 16 год, вологості повітря 60-80 %. Після 14 днів культивування у чашках Петрі, проростки томатів сортів Money Maker, Перлина та Лагідний висотою 1,5-2 см переносили у стерильні скляні циліндричні ємності із середовищем МСТ.

Асептичні рослини томатів розмножували мікроклонально. Для цього, ізолювали ділянки стебла довжиною 1-2 см, що містили пазушні бруньки, та переносили у стерильні ємності зі свіжим середовищем МСТ (Танасієнко та ін., 2014; Бузіашвілі та Ємець, 2016). Процес повторювали кожні 4-5 тижнів по мірі росту рослин.

2.3.1. Дослідження впливу різних факторів на регенерацію L. esculentum в умовах in vitro. Для удосконалення існуючих методів культивування та індукції регенерації рослин томатів в умовах *in vitro* було досліджено вплив різних комбінацій регуляторів росту рослин у складі середовища МСТ на експланти томатів 4 типів (сім'ядольні листки, гіпокотилі, листові диски та міжвузля). Для проведення даного дослідження було обрано 3 сорти *L. esculentum* – Money Maker (як модельний сорт, для якого розроблено протокол *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації (Jeroen et al., 1993) та 2 українські сорти – Лагідний та Перлина, для яких на сьогоднішній день не розроблено ефективних методик введення в культуру, отримання регенерантів в культурі *in vitro*, а також генетичної трансформації (Аветисян та Коломієць, 2013).

Сім'ядольні листки томатів відокремлювали від проростка та розрізали на 2-3 частини таким чином, щоб експланти мали розмір 2-3 мм. Так само від пагонів за допомогою стерильного леза відокремлювали верхівкову меристему та прикореневу частину та розрізали пагін на 2 частини так, щоб ділянки

гіпокотилія мали розмір 5-10 мм. Листкові диски та міжвузля ізолювали із стерильних рослин томатів, які вирощували в умовах *in vitro*. За допомогою леза із листкових дисків видаляли черешок та центральну жилку, розрізали листок на декілька частин, які мали розмір 5 мм. Міжвузлові ділянки стебла довжиною 1-1,5 см із бічною брунькою ізолювали, відділяючи черенки листків. Всі типи експлантів переносили у стерильні скляні чашки Петрі діаметром 9 см на живильні середовища на основі МСТ із додаванням фітогормонів.

Було досліджено вплив 10 різних комбінацій ауксину (індоліл-3-оцтової кислоти, ІОК) та цитокінінів (зеатину, Зеа та 6-бензиламінопурину (БАП)) в різних концентраціях у складі живильного середовища МСТ на частоту регенерації пагонів на експлантах томатів.

Зокрема, було використано наступні комбінації регуляторів росту рослин у складі середовища МСТ: 1 мг/л ІОК, 1 мг/л Зеа (МСТ1) (Khan et al., 2006; Chaudhry et al., 2010); 0.1 мг/л ІОК, 1 мг/л Зеа (МСТ2) (Břıza et al., 2008); 0.1 мг/л ІОК, 2 мг/л Зеа (МСТ3) (Jeroen et al., 1993; Frary & Earle, 1996), 0.1 мг/л ІОК, 3 мг/л БАП (МСТ4) (Shah et al., 2015); 0.5 мг/л ІОК, 2 мг/л БАП (МСТ5) (Sheng et al., 2015); 0.5 мг/л ІОК, 0.5 мг/л БАП (МСТ6) (Sheng et al., 2015), БАП 3 мг/л + НОК 1 мг/л (МСТ7) (Sohail et al., 2015), БАП 2 мг/л + НОК 1.5 мг/л (МСТ8) (Lutfun et al., 2013), БАП 0.5 мг/л + 2,4-Д 4 мг/л (МСТ9) (Sohail et al., 2015), БАП 2 мг/л + НОК 0.2 мг/л (МСТ10) (Sherkar & Chavan, 2014). Також, було використано базове живильне середовище МС (Murashige & Skoog, 1962), що містило 4,3 г/л макро- та мікросолей МС, 30 г/л сахарози та 8 г/л агару, рН 5.7.

Рослинний матеріал пересаджували на свіже середовище кожні 2 тижні по мірі збільшення розмірів рослин. Ефекти впливу фітогормонів оцінювали через місяць після початку експерименту, обраховуючи частоту регенерації пагонів. Даний показник обраховували як співвідношення кількості експлантів, на яких відбувалась регенерація пагонів, загальної кількості висаджених експлантів, помножене на 100%. У кожному експерименті використовували по 50-70 експлантів, досліди повторювали не менш ніж 3 рази. Статистичну обробку

даних проводили за використання критерія Ст'юдента для 5 %-го рівня значущості.

2.4. Культивування різних видів бактерій та грибів, використаних в дослідженні

Культури бактерій *R. solanacearum* ATCC 1169, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* Ac-1996, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* Ac-1995, гриба *F. sambucinum* F-52211 та ізолят *P. infestans* вирощували на середовищі картопляно-декстрозний агар (КДА) (Tournas et al., 1998). Для приготування картопляно-декстрозного агару, 200 г картоплі очищували, дрібно нарізали та кип'ятили 20 хв у 1 л дистильованої води. Відвар фільтрували через 2 шари капронової тканини, додавали 20 г/л декстрази та 15 г/л агару.

Культуру *A. tumefaciens* штаму ЕНА105 із плазмідним вектором pBin35LF вирощували на селективному твердому середовищі LB, що містило 10 г/л пептону, 5 г/л дріжджового екстракту, 10 г/л NaCl та 15 г/л агару (Sambrook et al., 2012) із додаванням канаміцину та рифампіцину у концентраціях 100 мг/л та 50 мг/л, відповідно.

Середовища стерилізували 25 хв при 121 °C та тиску 1,2 кПа, розчини антибіотиків та регуляторів росту рослин вносили у середовища після стерилізації.

Культури бактерій *R. solanacearum* ATCC 11696 (Yabuuchi et al., 1992), *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* Ac-1996 та *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* Ac-1995 (Подгорский и др., 2007) вирощували на твердому середовищі КДА та 1 раз на місяць переносили на свіже середовище. При цьому, за допомогою бактеріальної петлі культури наносили штрихами на чашки Петрі (d=9 см) зі свіжим середовищем, чашки Петрі культивували протягом 24 год за температури +28°C. Після наростання культури, чашки Петрі зберігали за температури +4°C. Також, у дослідженнях використовували суспензійні культури бактерій (у рідкому середовищі LB), які вирощували у центрифужних

пробірках об'ємом 50 мл протягом 24 год за температури +28°C та при постійному обертанні на роторному шейкері ELMİ S-3M A10 (ELMİ Ltd., Латвія) зі швидкістю 130 об/хв.

Культивування бактерії *A. tumefaciens* штаму ЕНА105 із плазмідною рВін35LF, яку вирощували на селективному середовищі LB із додаванням антибіотиків канаміцину та рифампіцину у концентраціях 100 мг/л та 50 мг/л, відповідно, та перенесення на свіже середовище здійснювали аналогічно до методики вирощування штамів *R. solanacearum* та *C. michiganensis*.

Для довготривалого зберігання штамів бактерій готували гліцерол-стоки бактеріальних культур. Для приготування гліцерол-стоків, клітини *A. tumefaciens*, *R. solanacearum* та *C. michiganensis* зазначених штамів культивували у середовищі LB протягом 16 год за температури +28°C до досягнення оптичної густини $OD_{600}=0.6$, далі 600 мкл бактеріальних культур переносили у стерильні мікроцентрифужні пробірки об'ємом 1,5 мл та змішували із 400 мкл гліцеролу. Гліцерол-стоки зберігали за температури -70°C. Процедуру повторювали 1 раз на рік.

Міцелій *P. infestans* та *F. sambucinum* культивували у чашках Петрі на середовищі КДА (Tournas et al., 1998) за кімнатної температури. Кожен місяць міцелій пасували на свіже живильне середовище. Для цього, в асептичних умовах за допомогою сталевого циліндра ($d=5$ мм) вирізали диски живильного середовища із міцелієм, і диски розміщували на свіжому агаризованому середовищі по центру чашки Петрі міцелієм догори. Чашки Петрі культивували при температурі +28°C протягом 10-14 діб до наростання міцелію до стінок чашки Петрі. Далі чашки Петрі культивували за кімнатної температури.

2.5. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація рослин картоплі та томату

*2.5.1. Штам *A. tumefaciens* та плазмідна конструкція для трансформації картоплі та томатів.* Трансформацію проводили за використання

супервірулентного штаму *A. tumefaciens* ЕНА 105, в якому було клоновано плазмідний вектор pBin35LF. Вектор містив ген лактоферину людини (*hLf*) під контролем 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV35S), а також ген неоміціофосфотрансферази II (*nptII*), що забезпечує стійкість до канаміцина (Танасієнко та ін., 2014; Vuziashvili et al., 2020a, 2020b). Схему плазмідного вектора наведено на Рис. 2.1.

Для трансформації, агробактерію культивували у центрифужних пробірках об'ємом 50 мл протягом 16 год. Суспензію бактерії вирощували до оптичної щільності $OD_{600}=0,6$ у 20 мл рідкого середовища LB (Sambrook et al., 2012) із додаванням 100 мг/л канаміцина, 50 мг/л рифампіцина при 28°C на роторному шейкері ELMi S-3M A10 (ELMI Ltd., Латвія) зі швидкістю 130 об/хв.

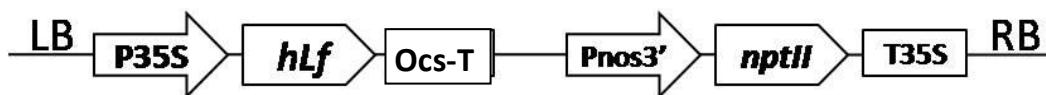


Рис. 2.1. Схема Т-ДНК бінарної плазмиди pBin35LF: LB та RB – ліва та права границі Т-ДНК, P35S – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти; *hLF* – ген лактоферину людини, OcsT – октопіновий термінатор, Pnos – промотор нопалінсинтетази, *nptII* – ген неоміціофосфотрансферази II; T35S – термінатор вірусу мозаїки цвітної капусти.

2.5.2. Методика *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації картоплі. Трансформацію проводили за методикою, описаною у (Жук та ін., 2009) із незначними змінами. Як експланти для трансформації картоплі використовували міжвузля пагонів довжиною 1,5-2 см, що містили 1-2 бічні бруньки. Експланти ізолювали із рослин, які вирощували протягом 30 діб у пробірках на живильному середовищі МСК. В кожному експерименті використовували по 30-60 експлантів картоплі. Трансформацію проводили одразу після ізолювання експлантів, без етапу прекультивування, оскільки при проведенні даного етапу відбувається передчасна регенерація нетрансгенних

пагонів. Інокуляцію суспензією агробактерії проводили протягом 30 хв, перед інокуляцією у суспензію вносили 0,15 мМ ацетосирингона (який розчиняли у ДМСО). Інокульовані експланти висушували на стерильному фільтрувальному папері та кокультивували з агробактерією протягом 16 год на середовищі МСК-К, до складу якого входило 4,3 г/л макро- та мікросолей МС (Murashige & Skoog, 1962), 30 г/л сахарози, 0,5 мг/л піридоксину, 0,5 мг/л нікотинової кислоти, 1 мг/л тіаміну, 2 мг/л гліцину, 100 мг/л міо-інозиту, 8 г/л агару, 0,5 мг/л БАП, 0,25 мг/л 2,4-Д, рН 5.7. Після кокультивування експланти переносили на середовище МСК-С1, склад якого був ідентичний до середовища МСК-К, але воно було доповнене 100 мг/л канаміцином (для селекції трансгенних ліній) та 600 мг/л цефотаксима (для елімінації бактеріальних клітин).

Після 1-го місяця селекції на середовищі МСК-С1 регенеровані пагони висотою 2-3 см із розвинутим листям та стеблами відділяли від експлантів та переносили у 20 см пробірки із середовищем МСК-С2, склад якого був ідентичний до середовища МСК, але із додаванням 100 мг/л канаміцину та 600 мг/л цефотаксима. Селекцію на середовищі МСК-С2 проводили протягом 2-х місяців для забезпечення стабільної інтеграції гена *hLf* в геном рослин.

Частоту трансформації картоплі визначали як співвідношення кількості експлантів, на яких регенерували пагони в умовах селективного тиску, до загальної кількості експлантів, взятих для трансформації, помножене на 100% (Jeroen et al., 1993). Після цього, стійкі до канаміцину пагони переносили на середовище МСК-Р (на основі середовища МСК із додаванням 600 мг/л цефотаксима), і через 1 місяць культивування проводили молекулярно-генетичний (ПЛР) та біохімічний аналіз (Вестерн блоттинг гібридизація) для підтвердження стабільної інтеграції гена *hLf* в геном відібраних ліній та ідентифікації лактоферина в них, як результат експресії перенесеного гена *hLf*. Проаналізовані трансгенні рослини далі висаджували в горшки діаметром 15 см у ґрунт для адаптації в умовах *in vivo* в теплиці.

2.5.3. Методика *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації томатів.

Трансформацію томатів здійснювали за методикою, описаною у (Танасієнко та ін., 2014) із незначними модифікаціями. Як експланти використовували сім'ядольні листки, які виділяли із 10-12-денних проростків та прекультивували протягом 24 год на середовищі МСТ. В кожному досліді з *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації томатів використовували 400-500 експлантів. Далі експланти інокулювали нічною культурою агробактерії ($OD_{600}=0.6$) протягом 20 хв з додаванням 0.15 мМ ацетосирингону та кокультивували протягом 16 год при 28°C.

Селекцію трансгенних ліній проводили протягом 3 місяців на середовищі МСТ-С (склад якого був аналогічний до середовища МСТ, але із додаванням 1 мг/л зеатину, 1 мг/л ІОК, 100 мг/л канаміцину, 600 мг/л цефотаксиму) для забезпечення стабільної інтеграції гена *hLf* в геном трансгенних ліній. Під час селекції, стійкі до канаміцину експланти із кластерами клітин калюсу та регенерованими пагонами переносили на свіже селективне середовище кожні 2-3 тижня.

Після 3 місяців селекції визначали частоту трансформації як співвідношення кількості експлантів, на яких регенерували пагони в умовах селективного тиску, до загальної кількості експлантів, які були взяті для трансформації, помножене на 100% (Jeroen et al., 2013). Далі, регенеровані пагони відділяли від калюсу та переносили на середовище МСТ-Р для подальшого росту та розвитку рослин.

Після 1 місяця культивування на середовищі МСТ-Р трансформовані лінії мікроклонально розмножували на середовищі МСТ для подальшого ПЛР-аналізу для підтвердження інтеграції гена *hLf* в геном рослин та Вестерн блот аналізу для підтвердження експресії лактоферина. Адаптацію рослин *in vivo* проводили в горщиках розміром 20x20x20 см в попередньо простерилізованому ґрунті в умовах теплиці.

2.6. Ізолювання плазмідної ДНК

Для ізолювання ДНК векторної конструкції pVin35FL, культуру *A. tumefaciens* інокулювали в 20 мл селективного середовища LB та вирощували протягом 24 год при температурі 28°C. Плазмідну ДНК ізолювали за використання методу лужного лізису (Sambrook et al., 2012). Для цього, бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням протягом 2 хв при 14 500 об/хв на центрифугу Eppendorf MiniSpin Plus (Німеччина). Осад ресуспендували у 125 мкл буферу P1 (50 mM Трис-НСl, рН 8.0, 10 mM ЕДТА) та інкубували 5 хв за кімнатної температури. Для лізису додавали 270 мкл лужного розчину Р2 (0.2 М NaOH, 1% ДСН (додецилсульфату натрію)). Обережно перемішували та інкубували 5 хв. Для зупинки процесу лізису до сумарного розчину додавали по 200 мкл охолодженого розчину Р3 (60 мл 5М ацетату калію, 11.5 мл льодяної оцтової кислоти, 28.5 мл дистильованої води) та інкубували 5 хв на льоду. Залишки зруйнованих бактеріальних клітин осаджували центрифугуванням протягом 15 хв при 16 000 об/хв за температури 4°C за використання центрифуги Eppendorff 5417R (Німеччина).

До надосадового розчину додавали ізопропіловий спирт у співвідношенні 1:1 (600 мкл), витримували 1 год за температури 4 °С, після чого розчин знову центрифугували 15 хв при швидкості 14 000 об/хв за температури 4 °С. Осад промивали 75%-ним етиловим спиртом, просушували на повітрі (10-15 хв) та розчиняли у бідистильованій воді. Концентрацію розчину ДНК вимірювали за допомогою спектрофотометра (Eppendorf BioPhotometer, Німеччина). Для ПЛР-аналізу використовували плазмідну ДНК у концентрації 1 мг/мл.

2.7. Ізолювання геномної ДНК з рослин за допомогою цетилтриметил амоній броміду (метод ЦТАБ)

Ізолювання геномної ДНК трансгенних і контрольних рослин картоплі і томатів проводили у відповідності до методу, описаному у (Rogers & Bendich,

1985), із незначними модифікаціями. Тканини листків масою 250-300 мкг переносили до 1,5 мл центрифужної пробірки та подрібнювали у рідкому азоті за допомогою пестика до стану пудри. Далі до розтертої тканини додавали 350 мкл 2х ЦТАБ (2%-вий ЦТАБ, 1,4 М NaCl, 100 мМ Трис-HCl, 20 мМ ЕДТА, рН 8,0). Суміш ретельно перемішували та інкубували у термостаті впродовж 1 год за температури 65°C. Під час інкубування суміш зрідка перемішували.

Далі клітинний лізат центрифугували 10 хв зі швидкістю 14 500 об/хв за використання центрифуги Eppendorf MiniSpin Plus (Німеччина). Після цього супернатант переносили до нових пробірок, додавали рівний об'єм суміші хлороформу та ізоамілового спирту (24:1 за об'ємом) й вміст ретельно перемішували до утворення суспензії. Центрифугували 10 хв зі швидкістю 14 500 об/хв. Знімали верхню водну фазу (~450 мкл) та переносили до нової центрифужної пробірки, і до неї додавали 0,2 об'єму (50 мкл) 5х ЦТАБ (5%-вий ЦТАБ, 350 мМ ЕДТА). Суміш обережно перемішували та інкубували в термостаті впродовж 10 хв за температури 65°C. Додавали рівний об'єм (500 мкл) хлороформу й ретельно перемішували, суспензію центрифугували 10 хв зі швидкістю 14 500 об/хв. Верхню водну фазу знімали і переносили в нові центрифужні пробірки. До супернатанту додавали 3 об'єми (600 мкл) буферу для преципітації (1%-вий ЦТАБ, 50 мМ Трис-HCl, рН 8,0, 10 мМ ЕДТА).

Суміш перемішували та інкубували протягом 24 год за кімнатної температури. Далі розчин центрифугували при 16 000 об/хв упродовж 10 хв за температури 4°C за використання центрифуги Eppendorf 5417R (Німеччина). Супернатант видаляли, а осад розчиняли в 300 мкл 1,2 М NaCl. Додавали 300 мкл хлороформу і суміш ретельно перемішували до утворення суспензії. Суспензію центрифугували зі швидкістю 16000 об/хв упродовж 10 хв за температури 4°C. Супернатант переносили в нові центрифужні пробірки і до нього додавали 0,6 об'єму (150-200 мкл) охолодженого ізопропанолу.

Далі розчин центрифугували при 16000 об/хв упродовж 10 хв за температури 4°C. Обережно зливали супернатант. До осаду додавали 250-300 мкл 70% етанолу. Центрифугували суміш при 16000 об/хв упродовж 10 хв за

температури 4°C. Спирт обережно зливали, залишки спирту висушували у термостаті за температури 65°C протягом 2-3 хв. Осад розчиняли у 20 мкл бідистильованої H₂O. Концентрацію ДНК визначали спектрофотометрично за використання біофотометра Eppendorf (Німеччина). Для ПЛР-аналізу використовували ДНК у концентрації 1 мг/мл. Ізольовану ДНК зберігали за температури -20°C.

2.8. ПЛР-аналіз трансгенних ліній томатів та картоплі

Для підтвердження інтеграції гена *hLf* в геном трансформованих ліній картоплі та томатів, проводили ампліфікацію геномної ДНК трансгенних ліній із праймерами, специфічними до гена лактоферину людини: *GL-F* (5'-TGTCTTCCTCGTCCTGCTGTTCC-3') та *GL-R* (5'-CATACTCGTCCCTTT-CAGCCTCG-3'). ПЛР-аналіз проводили в об'ємі 25 мкл. До складу реакційної суміші входили: 5x буфер для Таq-полімерази, 50–100 нг геномної ДНК, 0,2 мкМ кожного праймера, 200 мкМ кожного дНТФ, та 0.5 U Таq-ДНК-полімерази (Fermentas, Литва) (Tanasienko et al., 2011) Ампліфікацію здійснювали за таких умов: первинна денатурація протягом 3 хв при 94°C; 45 циклів по 30 с при 94°C, 30 с при 62°C, та 1 хв при 72°C; остаточний синтез протягом 7 хв при 72°C. ПЛР-аналіз проводили за використання ампліфікатора PCR Applied Biosystem 2720 (США). Продукти реакції розділяли за допомогою електрофорезу в 1%-ному агарозному гелі у присутності етидіум броміду. Ефективність трансформації томатів та картоплі визначали як співвідношення кількості рослин із підтвердженою інтеграцією гена *hLf* до загальної кількості трансформованих експлантів, помножене на 100%.

2.9. Вестерн блот аналіз трансгенних ліній томатів та картоплі

Для підтвердження експресії лактоферина в трансгенних лініях, проводили Вестерн блот гібридизацію тотальної фракції білка трансгенних рослин із

моноклональними антитілами до лактоферину. Тотальну фракцію білка отримували відповідно до оригінальної методики (Mitra & Zhang, 1994) із незначними модифікаціями. Для цього, використовували буфер для екстракції, до складу входило 50 мМ Трис-НСl (рН 6.5), 1 мМ ЕДТА, 100 мМ NaCl, 0.1% Triton X-100 (Rachmawati et al., 2005) із додаванням суміші інгібіторів протеаз (P9599, Sigma-Aldrich) у концентрації 10 мкл/мл. 1 г тканин (листіків та пагонів) трансгенних та нетрансгенних (контрольних) рослин гомогенізували у рідкому азоті у присутності 100 мкл буфера для екстракції. Після гомогенізації, зразки центрифугували 30 хв при 4°C зі швидкістю 16 000 об/хв за використання центрифуги Eppendorf 5417R (Німеччина) та відбирали надосадову рідину. Концентрацію тотального білка у зразках вимірювали за допомогою методу Бредфорда (Bradford, 1976). Як позитивний контроль використовували бичачий лактоферин (L9507, Sigma-Aldrich). Зразки розділяли за допомогою електрофорезу в 12%-му поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах (Laemmli, 1970) та переносили на нітроцелюлозну мембрану (RPN3032D, GE Healthcare, Mickleton, США) за використання апарату Bio-Rad Criterion™ Blotter (Bio-Rad, США) при 250 мА. Після перенесення мембрану блокували протягом ночі при 4°C в 5%-му знежиреному сухому молоці у буфері TBS-T (20 мМ Трис-НСl, 15 мМ NaCl, 0.1% Triton X-100, рН 8.0) та інкубували із первинними кролячими антитілами проти лактоферину (1:15000) (Merck Millipore, CA, США), а потім з вторинними анти-кролячими антитілами кози, кон'югованими із пероксидазою хрому (1:5000) (A4914, Sigma-Aldrich, США). Сигнал посиленої хемілюмінесценції фіксували після інкубації мембрани із ECL буфером (0,1М Трис-НСl, рН 8,5, 250 мМ люмінола, 90 мМ кумарової кислоти, 30% H₂O₂) для експозиції протягом 1 хв за використання апарату ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad, США). Результати Вестерн блот гібридизації аналізували за використання програмного забезпечення ImageLab™ 2.0.

2.10. Біотести на стійкість до фітопатогенів трансгенних ліній

Для визначення рівня затримки росту бактеріальних та грибних патогенів в результаті впливу зразків, отриманих з трансгенних рослин картоплі та томату, проводили тест “дифузії в агар”. Як фітопатогени, як було зазначено вище, використовували штами бактерій *Ralstonia solanacearum* ATCC 11696 (що є збудником бактеріального в’янення томатів та бурої гнилі картоплі) та *Clavibacter michiganensis* (а саме, підвидів *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* Ac-1996, що викликає бактеріальний рак томатів, та *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* Ac-1995, що є збудником кільцевої гнилі картоплі). Також, було досліджено фунгістатичний вплив зразків трансгенних рослин на грибний патоген *Phytophthora infestans* (ізолят високовірулентної раси 1.2.3.4.5.6.6+0.7.8.9.10.11 хуз) , що викликає, відповідно, фітофтороз картоплі та бурю гниль томатів, та *Fusarium sambucinum* F-52211, що спричиняє суху гниль картоплі.

Приготування зразків здійснювали наступним чином. Свіжий сік трансгенних та контрольних рослин томатів та картоплі ізолювали із 1 г рослинного матеріалу (пагонів та листя). Для цього, рослинні тканини гомогенізували в мікроцентрифужних пробірках на 1,5 мл за допомогою пестика без додавання розчинників та центрифугували 10 хв при 13 400 об/хв за використання центрифуги Eppendorf MiniSpin (Німеччина). Супернатант стерилізували через фільтри (0,45 мкм) та одразу використовували для аналізу (Онуога & Alisa, 2013).

Комерційний лактоферин (Jarrow Formula, США) розчиняли в дистильованій воді і також стерилізували крізь нітроцелюлозні фільтри (0,45 мкм). У дослідженні використовували концентрації лактоферину 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 та 2 мг/мл, на диски наносили по 20 мкл зразків.

2.10.1. Дослідження бактерицидного та фунгістатичного впливу зразків із трансгенних рослин. Тест “дифузії в агар” для бактеріальних культур

проводили відповідно до методики (Chahardoli et al., 2015) із незначними модифікаціями. Для проведення даного тесту, використовували нічні культури бактерій, вирощені у рідкому середовищі LB, з оптичною щільністю $OD_{600} = 0,1$, і 100 мкл суспензії, що містила 10^8 КУО, інокулювали на чашках Петрі діаметром 9 см із середовищем КДА (картопляно-декстрозний агар). Бактеріальну суспензію розподіляли за допомогою стерильного скляного шпателя по поверхні середовища, після чого розміщували диски стерильного фільтрувального паперу діаметром 5 мм, і на них наносили по 20 мкл зразків, ізольованих із трансгенних та контрольних рослин, а також комерційний лактоферин (Jarrow Formulas, США) (позитивний контроль). Далі чашки Петрі інкубували протягом 16 год при 28°C . Антимікробну активність визначали, вимірюючи радіус зон затримки росту навколо дисків фільтрувального паперу, на який наносили відповідний зразок.

Для визначення фунгістатичного впливу на *P. infestans* та *F. sambucinum* зразків трансгенних ліній томатів та картоплі також використовували лінії з підтвердженою експресією лактоферину та контрольні (нетрансгенні) лінії. Фунгістатичний вплив визначали за використання тесту “дифузії в агар”, який проводили за методикою, описаною у (Han et al., 2012) з деякими модифікаціями.

Для проведення тесту в чашки Петрі ($d=9$ см) вносили середовище КДА, в середовищі вирізали циліндричні лунки ($d=5$ мм), в які додавали по 100 мкл зразків трансгенних та нетрансгенних рослин, після чого по центру чашки Петрі розміщували диск агару із міцелієм *P. infestans* або *F. sambucinum*. Чашки Петрі інкубували 10 діб за температури 28°C . Фунгістатичну активність лактоферину визначали візуально, відмічаючи затримку росту міцелію та зниження інтенсивності утворення конідій навколо лунок із соком рослин.

2.10.2. *Визначення стійкості трансгенних рослин та тканин до фітофторозу та фузаріозу методом зараження in vitro.* Також, стійкість трансгенних ліній томатів та картоплі визначали за використання методу зараження *in vitro*, розробленою Інститутом картоплярства НААН України

(Ткачик, 2014). В кожному експерименті використовували по 10 трансгенних та контрольних рослин висотою 7-10 см, які вирощували протягом 2 тижнів. Зараження рослин проводили за використання інокуляту із кількістю конідій $3-3,5 \cdot 10^4$ /мл, які обраховували за допомогою камери Горяєва. Конідії змивали стерильною дистильованою водою з культур *P. infestans* або *F. sambucinum*, які вирощували протягом 10 діб в чашках Петрі на середовищі КДА.

Для виходу зооспор суспензію конідій витримували 4 год при 4°C , після чого на рослини наносили по 300 мкл інокуляту за допомогою ручного обприскувача. Результати зараження оцінювали на 1-у, 4-у та 8-у добу експерименту, враховуючи такі симптоми, як в'янення, наявність некротичних плям на листках та стеблах та поява міцелію на живильному середовищі та органах рослин. На 8-й день після зараження, оцінювали стійкість трансгенних та контрольних ліній за 9-бальною шкалою, за якою 9 балам відповідає відсутність ураження, 8 балам – відсутність симптомів на стеблах та поодинокі плями на 5% листків, 6-7 балам – відсутність симптомів на стеблах та ушкодження 5-25% листків, 4-5 балам – ознаки в'янення на 25% стебел та плями некрозу на 25-50% листків, 2-3 балам – в'янення та некроз покривають 25-50% поверхні стебел та 50-75% листків, та 1 балу відповідає ушкодження більш ніж 75% поверхні всієї рослини.

Стійкість відокремлених листків трансгенних та контрольних рослин томатів до фітофтори визначали відповідно до методики, розробленою Інститутом картоплярства НААН України (Ткачик, 2014), з деякими змінами. Для цього, листки томатів розміром 1,5-2 см відокремлювали від рослин, вирощених в культурі *in vitro*, та розміщували у чашках Петрі на 4 шарах фільтрувального паперу, змоченого стерильною дистильованою водою. На адаксіальну сторону листків наносили по 10 мкл інокуляту з кількістю конідій $3-3,5 \cdot 10^4$ /мл. Як контроль на листки наносили по 10 мкл стерильної дистильованої води.

Частоту ураження відокремлених листків визначали через 8 діб як співвідношення кількості листків з вираженими некротичними плямами до загальної кількості заражених листків, помножене на 100%.

2.11. Статистична обробка отриманих даних

Всі експерименти повторювали 3 або більше разів. Достовірність відмінностей між середніми значеннями підтверджували за використання t-критерію Ст'юдента для 0,05% рівня значущості. Побудову графіків та діаграм проводили із застосуванням програмного забезпечення Microsoft Office Excel 2010.

РОЗДІЛ 3
ОТРИМАННЯ ТА АНАЛІЗ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН
S. tuberosum З ГЕНОМ *hLf*

3.1. Перенесення гена *hLf*, отримання трансгенних ліній картоплі та їх ПЛР-аналіз

З метою підвищення стійкості картоплі до фітопатогенних бактерій та грибів було здійснено перенесення гена лактоферина людини у геном картоплі сортів Вернісаж, Левада, Світанок Київський та Зарево за використання метода *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. Сорти картоплі Вернісаж, Левада, Світанок Київський та Зарево – відомі українські сорти картоплі, які володіють помірною чутливістю до деяких

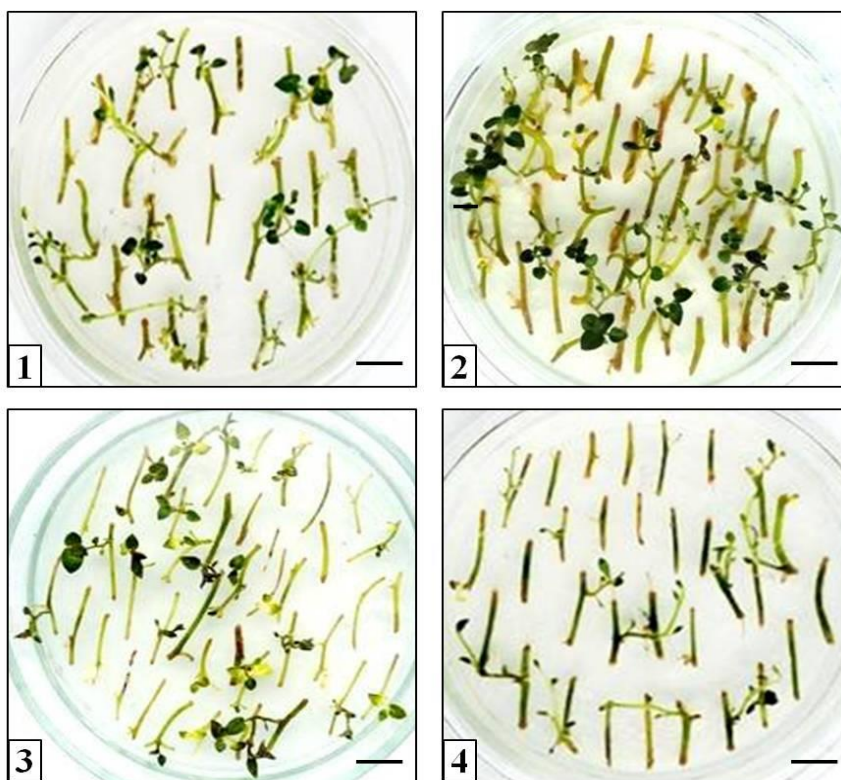


Рис. 3.1. Експланти картоплі, трансформовані геном *hLf*, які культивували протягом 1 місяця на середовищі МСК-С1: 1 – сорту Вернісаж, 2 – сорту Світанок Київський, 3 – сорту Левада, 4 – сорту Зарево. Масштабна позначка – 1 см.

хвороб (фітофторозу, альтернаріозу, кільцевої та бурої гнилі) (Чередниченко, 2013; Podhaietskyi et al., 2018; Michalska et al., 2016). Ці сорти придатні як для технічного використання (Вернісаж, Левада), так і для вживання у їжу (Світанок Київський, Зарево) (Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні на 2020; Бузіашвілі та ін., 2018, 2019), тому вони були обрані нами для проведення досліджень по генетичній трансформації.

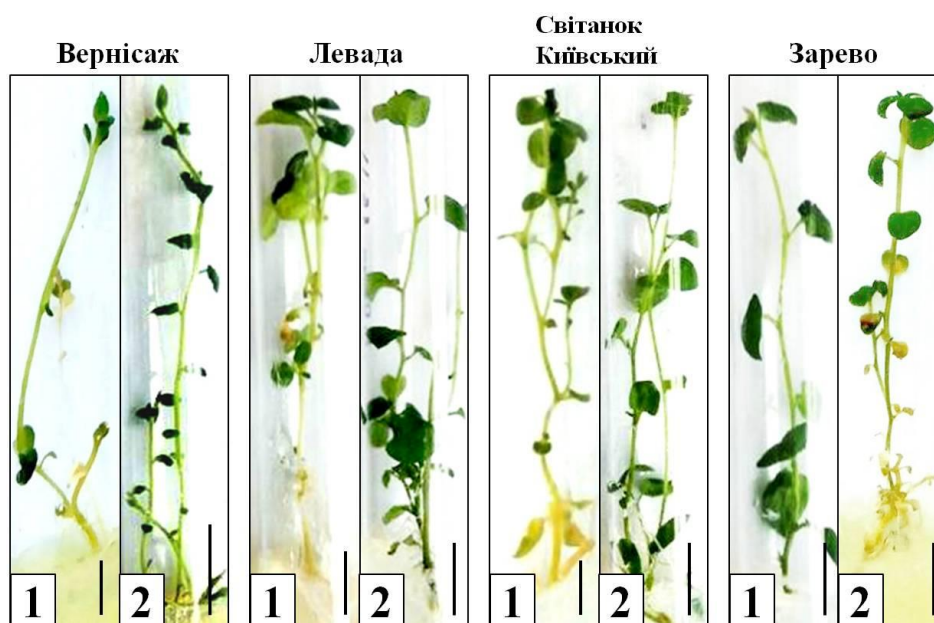


Рис. 3.2. Регеновані пагони картоплі сортів Вернісаж, Світанок Київський, Левада та Зарево, трансформовані геном *hLf*, через 2 місяці селекції на середовищі МСК-С2 (1) та трансгенні рослини через 1 місяць культивування на середовищі МСК-Р (2). Масштабна позначка – 1,5 см.

Як експланти для трансформації було використано міжвузля, оскільки в інших дослідженнях з генетичної трансформації картоплі ефективність трансформації за використання цього типу експлантів була більш високою, ніж за використання листкових дисків (Molla et al., 2011; Nan et al., 2015; Bakhsh et al., 2020; Kaur et al., 2017).

Через 2 тижні культивування та селекції на середовищі МСК-С1 на

протрансформованих експлантах картоплі з'являлись регеновані пагони. Протягом наступних 2 тижнів культивування на чашках Петрі із селективним середовищем МСК-С1, яке містило 100 мг/л канаміцина, у

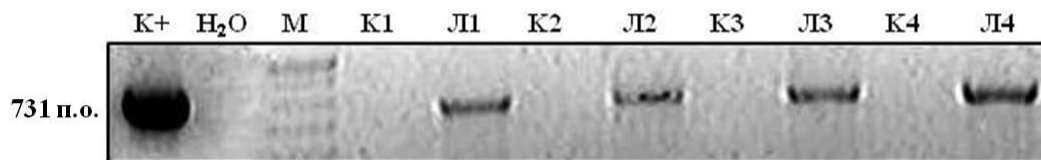


Рис. 3.3. Результати ПЛР-аналізу геномної ДНК картоплі за використання праймерів, специфічних до гена *hLf*: K+ – позитивний контроль (векторна конструкція pVin35LF); H₂O – негативний контроль (ампліфікація у відсутності ДНК); M – маркер довжин фрагментів ДНК; K1, K2, K3, K4 – контрольні (нетрансгенні) лінії; L1, L2, L3, L4 – ампліфікований фрагмент гена *hLf* розміром 731 п.о. у зразках трансгенних ліній; K1, L1 – сорт Вернісаж, K2, L2 – сорт Левада; K3, L3 – сорт Світанок Київський; K4, L4 – сорт Зарево.

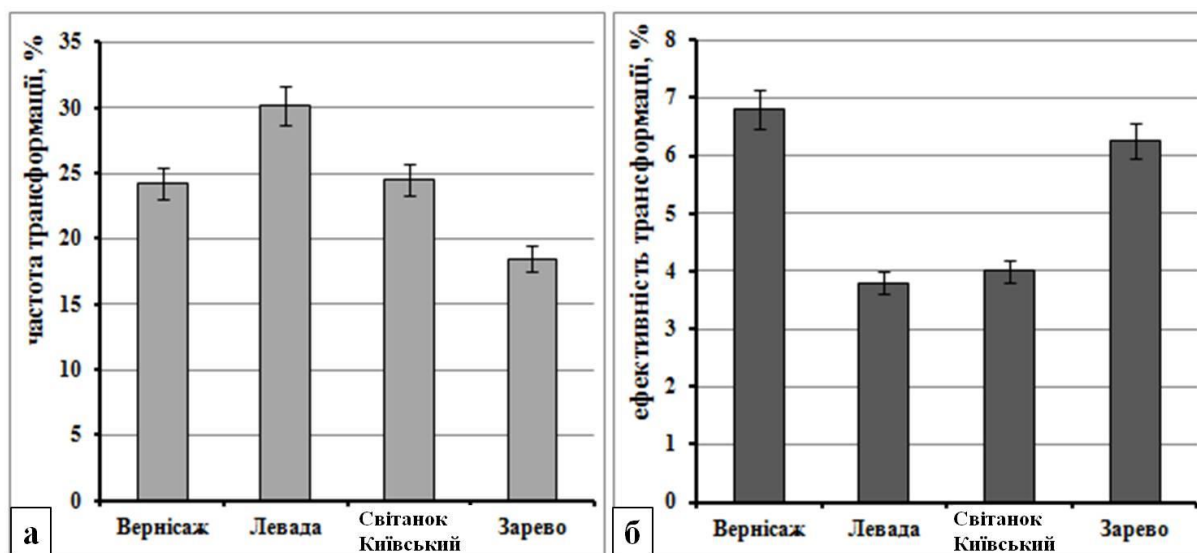


Рис. 3.4. Частота (а) та ефективність (б) трансформації картоплі сортів Вернісаж, Левада, Світанок Київський та Зарево геном *hLf*.

деяких пагонів спостерігали затримку росту, вони жовтіли та гинули (Рис.

3.1.). Через 1 місяць селекції рослини висотою 2-3 см із темно-зеленим листям, добре розвиненими стеблами та корінням відокремлювали від експлантів та переносили в пробірки із середовищем МСК-С2 (Рис. 3.2, 1). Далі протягом 2 місяців рослини культивували на середовищі МСК-С2, яке також містило канаміцин, як селективний агент, у концентрації 100 мг/л. Відібрані лінії з нормальною морфологією, подібною до такої у контрольних (нетрансгенних) рослин, переносили на середовище МСК-Р (яке не містило канаміцину, але до складу якого входило 600 мг/л цефотаксима) для їх подальшого росту та розвитку (Рис. 3.2, 2). В результаті селекції для ПЛР-аналізу було відібрано 44 лінії картоплі сорту Вернісаж, 26 ліній сорту Левада, 25 ліній сорту Світанок Київський та 16 ліній сорту Зарево, стійких до канаміцину. Інтеграцію гена лактоферину було підтверджено в 1 лінії кожного сорту, використаному у дослідженні (Рис. 3.3). Частота трансформації картоплі за результатами селекції становила 24,2, 30,2, 24,5 та 18,5% (Рис. 3.4, а), а ефективність трансформації за результатами ПЛР була на рівні 6,8, 3,8, 4 та 6,25% (Рис. 3.4, б) для сортів Вернісаж, Левада, Світанок Київський та Зарево, відповідно.

В аналогічних дослідженнях, ефективність трансформації картоплі становила 0,5-18,4% (Han et al., 2015) та 1,2-10,7% (Shin et al., 2011) – такі значення співставні з результатами даного дослідження. Однак, деякі автори повідомляють про більш високу ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації картоплі (до 68%) за використання міжвузлових сегментів стебла як експлантів (Soto et al., 2007; Craze et al., 2018). Було проведено ряд досліджень, спрямованих на визначення впливу різних факторів на ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, серед яких найбільш важливими є генотип рослинного організму, тип промоторів у плазмідних векторах, тип штамів *A. tumefaciens* (Alimohammadi & Bagherieh-Najjar, 2009; Orabode, 2006; Bakhsh et al., 2014; Gelvin & Liu, 1994). Очевидно, що для подальшого підвищення

ефективності *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації картоплі можливо додатково підбирати необхідні умови. Лінії, в яких було підтверджено інтеграцію гена *hLf*, адаптовали і вирощували в умовах закритого ґрунту для проведення подальшого аналізу.

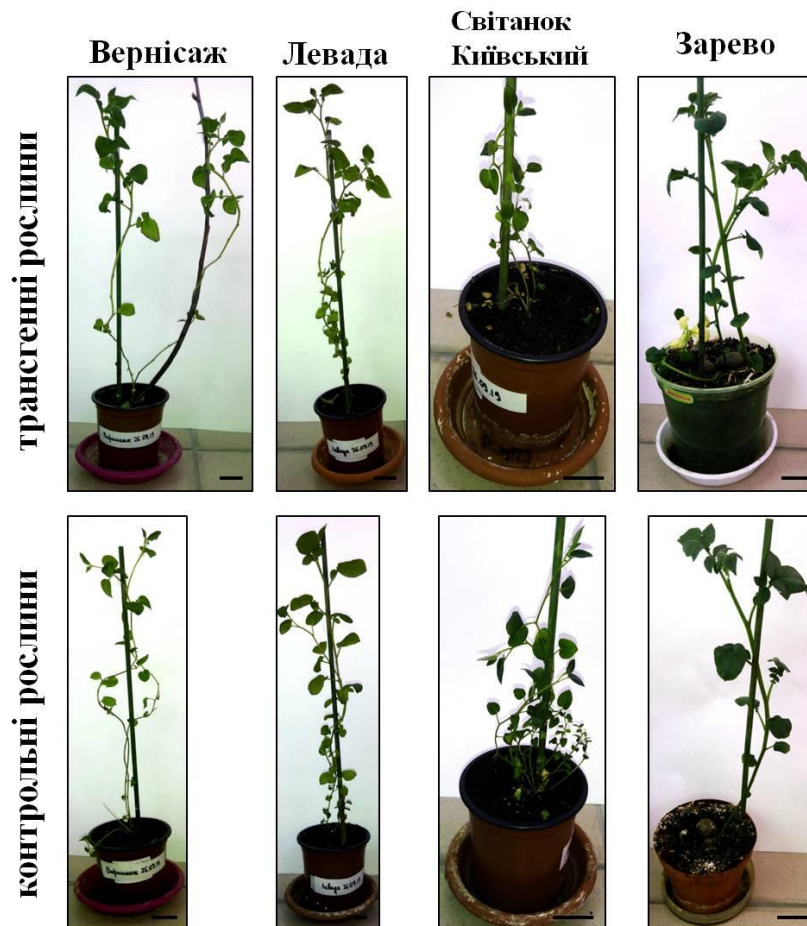


Рис. 3.5. Трансгенні та контрольні (нетрансгенні) рослини картоплі, адаптовані в умовах *in vivo*. Масштабна позначка – 3 см.

Було виявлено, що морфологія трансгенних рослин нічим не відрізнялась від морфології контрольних рослин (Рис. 3.5).

3.2. Вестерн блот аналіз трансгенних ліній картоплі

Для підтвердження експресії лактоферина людини в трансгенних лініях картоплі проводили Вестерн блоттинг гібридизацію за використання моноклональних антитіл, специфічних до лактоферину. В результаті проведеного аналізу в усіх досліджуваних зразках було виявлено

рекомбінантний лактоферин. Молекулярна маса ідентифікованого білка знаходилась в межах 80 кДа, що відповідає позитивному контролю (бичачий лактоферин), зокрема, як це показано для трансгенної лінії сорту Зарево на Рис. 3.6. Таким чином, отримані дані свідчать не лише про перенос та інтеграцію гена лактоферину в геном досліджуваних сортів картоплі, але й про його експресію в трансгенних лініях.

За допомогою денситометричного аналізу було встановлено, що вміст рекомбінантного лактоферину, наприклад, в одній із трансгенних ліній картоплі сорту Зарево (Рис. 3.6) становив близько 0,05% від загальної кількості тотального розчинного білка. Ці результати також співставні з рівнями експресії лактоферина людини в трансгенних лініях люцерни, які були отримані за використання подібної векторної конструкції з геном *hLf*, який, як і в нашому дослідженні, також знаходився під контролем 35S промотора (Stefanova et al., 2013a). Хоча рівні експресії рекомбінантного лактоферину в різних видах рослин суттєво відрізняються і навіть можуть бути вищими за рівень експресії, зазначений вище (Vlahova et al., 2005; Legrand et al., 2003), наразі відоме лише одне аналогічне дослідження з генетичної трансформації картоплі геном лактоферина під контролем P2 промотора ауксин-індукованої манопінсинтази і тандемного 35S промотора. В зазначеному дослідженні було показано, що вміст рекомбінантного лактоферина був на рівні 0,01% від загальної кількості тотального розчинного білка (Chong & Langrudge, 2000).

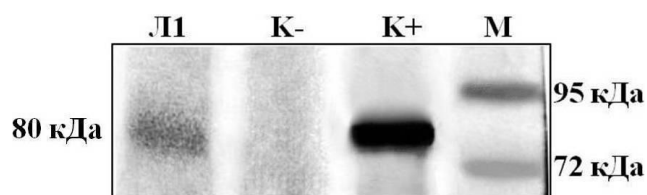


Рис. 3.6. Результати ідентифікації рекомбінантного лактоферина за допомогою Вестерн блоттинга: Л1 – трансгенна лінія картоплі сорту Зарево, К – контрольна рослина, К⁺ – бичачий лактоферин (позитивний контроль), М – маркер молекулярної маси білків.

Для інших трансгенних ліній картоплі вміст рекомбінантного лактоферину в надземній частині рослин був співставний з лінією сорту Зарево, тобто був в межах 0,04-0,05%.

3.3. Біотести на стійкість трансгенних ліній картоплі до фітопатогенів

3.3.1. Дослідження антибактеріального впливу зразків трансгенних ліній картоплі. Антибактеріальну активність зразків трансгенних ліній картоплі оцінювали за використання фітопатогенних бактерій *R. solanacearum* штаму ATCC 11696 (Yabuuchi et al., 1992) та *S. michiganensis* subsp. *sepedonicus* штаму Ас-1996 (Подгорский и др., 2007). Варто зазначити, що ці види фітопатогенних бактерій є карантинними мікроорганізмами та знаходяться в переліку регульованих шкідливих організмів в Україні та по всьому світі, оскільки наразі не існує культурних сортів томатів та картоплі, які мають гени стійкості проти даних фітопатогенів (Про внесення змін до Переліку регульованих шкідливих організмів, 2019; Patil et al., 2012; Sen et al., 2013). Результати тесту “дифузії в агар” при дослідженні трансгенної лінії сорта Зарево представлені на Рис. 3.7.

Зокрема, було встановлено, що зони затримки росту бактерій були помітні біля дисків, на які наносили свіжоізольовані зразки трансгенних рослин, що можна пояснити наявністю у зразку рекомбінантного лактоферину, який володіє антибактеріальною активністю (Рис. 3.7, 1). Слід зазначити, що зразки контрольних (нетрансгенних) рослин не інгібували ріст бактерій *S. michiganensis* та *R. solanacearum* (Рис. 3.7, 2). Подібні дослідження було також проведено для трансгенних ліній картоплі сортів Вернісаж, Левада та Світанок Київський, і результати досліджень були аналогічними, тобто, був показаний антибактеріальний вплив на *S. michiganensis* та *R. solanacearum* зразків, отриманих із трансгенних ліній, та відсутність такого впливу для зразків із контрольних ліній. Отримані дані відповідають результатам, описаним раніше

при дослідженні антибактеріальної активності ТРБ із трансгенних рослин, що експресують лактоферин людини. У попередніх дослідженнях було показано антибактеріальні властивості рекомбінантного лактоферину чи його фрагментів, отриманого у результаті експресії в трансгенних рослинах тютюну (Zhang et al., 1998; Fukuta et al., 2012; Sohrabi et al., 2014; Chahardoli et al., 2018), рису (Rachmavati et al., 2005; Humphrey et al., 2003; Lee et al., 2010b; Takase et al., 2005; Franco et al., 2012; Funakoshi et al., 2017), картоплі (Chong & Langridge, 2000), томату (Lee et al., 2002), женьшеню (Jo et al., 2006; Kwon et al., 2003), люцерни (Stefanova et al., 2013a, 2013b), груші (Malnoy et al., 2003), зокрема, їх дія приводила до інгібування росту таких бактерій, як *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. syringae*, *E. amylovora*, *R. solanacearum* та *E. amylovora*.

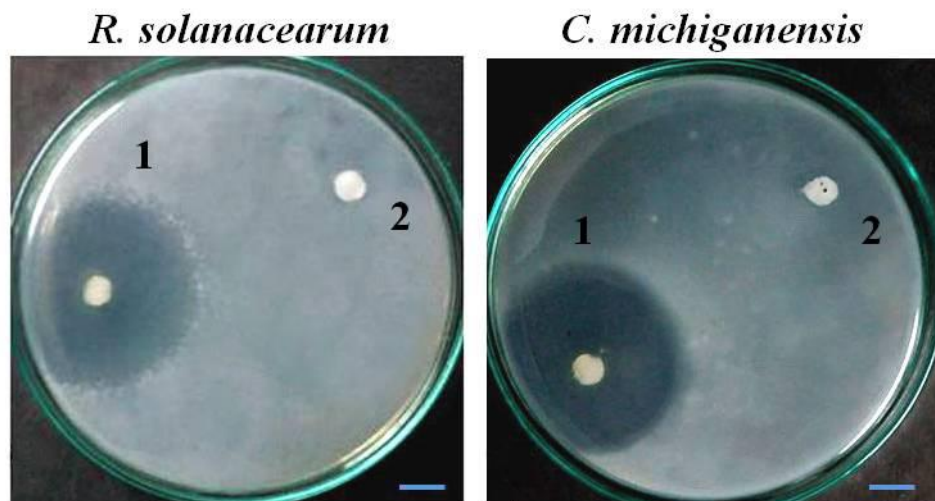


Рис. 3.7. Результати впливу зразків контрольних та трансгенних ліній картоплі сорту Зарево на бактерії *R. solanacearum* та *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*: 1 – трансгенна лінія, що експресує ген *hLf*, 2 – контроль (нетрансгенна рослина). Масштабна позначка: 1 см

У одному з досліджень (Chong & Langridge, 2000) було отримано лінії картоплі, що експресували ген *hLf*, та показано антибактеріальну активність тотального білка, ізольованого з бульб трансгенних рослин, проти 3-х умовно-патогенних для людини видів бактерій (*E. coli*, *S. aureus*, *S. paratyphi*). В

нашому дослідженні вперше було показано, що зразки, отримані із трансгенних ліній картоплі, що експресували лактоферин, володіють антибактеріальною активністю по відношенню до фітопатогенних бактерій *R. solanacearum* та *S. michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Отже, такі лінії картоплі можуть характеризуватися підвищеною стійкістю до хвороб, спричинених даними бактеріями, і в умовах *in vivo*.

3.3.2. Дослідження фунгістатичного впливу зразків із трансгенних ліній картоплі. Результати тесту “дифузії в агар” показали затримку росту міцелію *P. infestans* та *F. sambucinum* та інгібування процесу утворення конідій *P. infestans* біля лунок у середовищі КДА, в які вносили зразки трансгенних

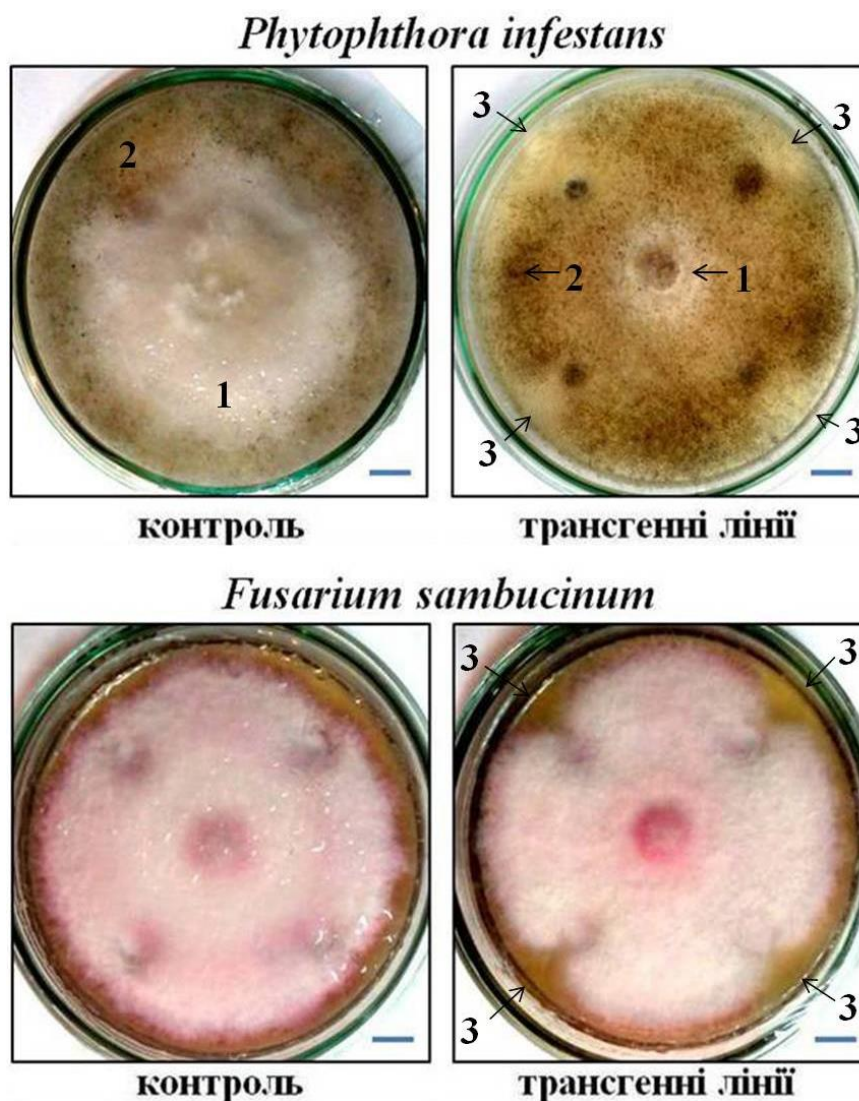


Рис. 3.8. Вплив зразків трансгенних та контрольних ліній картоплі сорту Зарево на ріст *P. infestans* та *F. sambucinum*. 1 – міцелій *P. infestans*, 2 – конідії *P. infestans*, 3 – зони інгібування росту. Масштабна позначка: 1 см

рослин (Рис. 3.8, 1-3). Фунгістатичного впливу зразків із контрольних рослин не було відмічено (Рис. 3.8, 1, 2). Фунгістатична активність зразків трансгенних рослин може бути пояснена експресією лактоферину в лініях картоплі.

3.3.3. *Аналіз стійкості до фітофторозу та фузаріозу трансгенних ліній картоплі в умовах in vitro.* Також, досліджували стійкість трансгенних ліній картоплі до *P. infestans* та *F. sambucinum* в умовах *in vitro*. Для цього використовували по 10 трансгенних рослин, що експресують лактоферин, та по 10 контрольних (нетрансгенних) рослин картоплі. Рослини обприскували суспензією конідій *P. infestans* або *F. sambucinum* у концентрації $3,5 \times 10^4$ /мл після виходу зооспор. Ефекти зараження оцінювали протягом 8 діб. Так, через добу після інокуляції симптоми зараження були відсутні як на трансгенних, так і на контрольних рослинах (Рис. 3.9). На 4-у добу після інокуляції конідіями грибів більш ніж 75% листя контрольних рослина зав'яло, і на живильному середовищі біля стебел контрольних рослин виріс міцелій. В той же час, на трансгенних рослинах лише 25-50% листя було ушкоджено, їх листки, в основному, залишались темно-зеленими та неушкодженими, і на живильному середовищі біля основи стебла трансгенних рослин не спостерігали розвитку міцелію (Рис. 3.9). На 8-у добу після зараження всі контрольні рослини в'янули, оскільки були повністю уражені грибом, тоді як ураження трансгенних рослин сягало лише 50-75%, а деякі рослини в умовах зараження продовжували рости та розвиватись (Рис. 3.9). Результати оцінки зараження *in vitro* нетрансгенних ліній картоплі, які експресували ген *hLf*, зокрема, як це показано для сорту Зарево, свідчать про підвищення стійкості трансгенних рослин у порівнянні із контрольними з 1 до 7 балів за 9-бальною шкалою – до *P. infestans*, та з 2 до 7 балів – до *F. sambucinum* (Рис. 3.9).

Хоча сорт Зарево має відносну стійкість до деяких хвороб (Чередниченко, 2012, 2013; Завірюха та ін., 2014, 2015; Воробйова, 2013; Podhaietskyi et al., 2018; Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні на 2020; Литвак та Левченко, 2002; Douches et al., 1997; Visognin et al., 2002;

Мельничук та ін., 2014), важливо відмітити, що фітофтороз щорічно спричиняє збиток виробникам більш ніж на 3 млрд. долл. США (Fry, 2008; Dominguez et al., 2018). Хвороби рослин, спричинені бактеріальними та грибовими патогенами, важко піддаються контролю через швидкі темпи появи нових високопатогенних штамів. Більш того, глобалізація та уніфікація світової торгової політики, а також глобальні зміни клімату все більше впливають на розповсюдження фітопатогенів на нові території

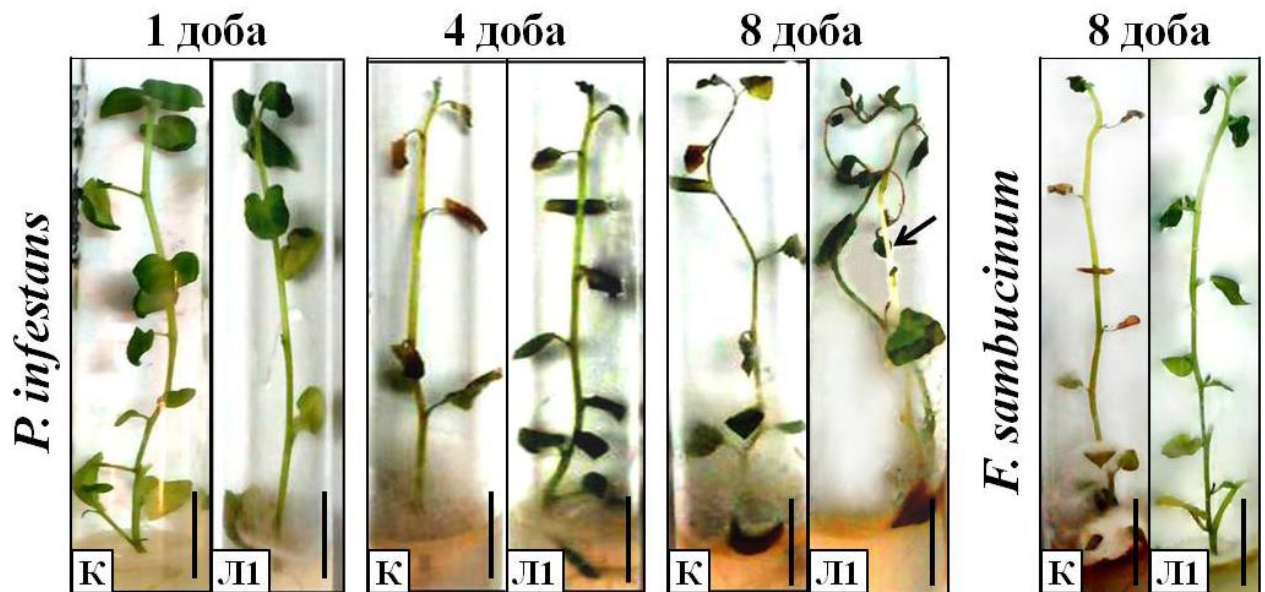


Рис. 3.9. Результати біотесту на чутливість картоплі сорта Зарево до *P. infestans* та *F. sambucinum* в умовах *in vitro*: 1 К – контрольна лінія, Л1 – трансгенна лінія. Стрілка вказує на регенований пагін, не ушкоджений *P. infestans*. Масштаб: 1.5 см.

(Fry, 2008; Dominguez et al., 2018). Інтенсивний розвиток біотехнології рослин за останні 30 років, зокрема, результати дослідження біохімічних та молекулярно-біологічних механізмів взаємодії рослини із патогеном, надають все більше можливостей для покращення стійкості культурних рослин до різних хвороб (Jung & Kang, 2014; López-García et al., 2012; Moosa et al., 2017; Dahleen et al., 2001; Marcos et al., 2008; Osusky et al., 2000; Patil et al., 2012).

В 1994 р. було опубліковано результати першого дослідження з доставки гена *hLf* у рослинний геном (до клітин калюсу тютюну) (Mitra & Zhang, 1994). В 1998 р. тими ж авторами було показано значне підвищення стійкості до фітопатогенних бактерій рослин тютюну (*N. tabacum*), що експресують ген *hLf* (Zhang et al., 1998). З того часу було проведено ряд досліджень з переносу гена лактоферину в геноми різних видів культурних рослин з метою підвищення якості продуктів харчування та перевірки можливості підвищення стійкості рослин до різних фітопатогенів (Stefanova et al., 2008; Yemets et al., 2014; Lakshman et al., 2013). Фунгіцидну активність лактоферина було виявлено в інших дослідженнях в умовах *in vitro* та *in vivo* проти деяких дріжджових та міцеліальних грибів, зокрема, *Candida* sp., *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* (Bruni et al., 2016; Fernandes & Carter, 2017; Han et al., 2012; Nguyen et al., 2011; Fukuta et al., 2012). Так, було показано фунгістатичний ефект рекомбінантного бичачого лактоферина (*bLf*) після його перенесення та експресії в геномах рослин *A. thaliana* та *N. tabacum* проти *Rhizoctonia solani* (збудника чорної парші) (Nguyen et al., 2011); також було встановлено, що експресія бичачого лактоферина підвищує стійкість *N. tabacum* проти *Botrytis cinerea* (збудника сірої гнилі) (Fukuta et al., 2012), і, крім того, підвищення стійкості трансгенної пшениці, що експресує *bLf*, проти *Fusarium graminearum* (збудника фузаріозу зернових культур) (Han et al., 2012). В нашій роботі вперше було показано, що рослини картоплі, що експресують лактоферин, мають підвищену стійкість до високовірулентних фітопатогенних грибів *P. infestans*, збудника фітофторозу, та *F. sambucinum*, що викликає суху гніль картоплі.

Результати досліджень, описані у Розділі 3, опубліковані в наступних статтях та тезах:

Buziashvili AYu, Cherednichenko LM, Kropyvko SV, Blume YaB, Yemets AI. Obtaining transgenic potato plants expressing the human lactoferrin gene and analysis of their resistance to phytopathogens. Cytol. Genet. 2020;54(3):179–188. <https://doi.org/10.3103/S0095452720030020>.

Бузіашвілі АЮ, Ємець АІ. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація українських сортів картоплі та томату геном лактоферину людини. Доповіді НАН України. 2018;10:88-94. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.10.088>. (Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, аналіз експериментальних даних, написання статті).

Buziashvili AY, Yemets AI. Obtaining of phytopathogen-resistant tomato and potato plants with human lactoferrin gene. Abstracts of the 4th International Symposium on Euroasian Biodiversity. July 3-6 Kyiv. 2018, p. 12.

Yemets AI, **Buziashvili AY.** Lactoferrin expression as a tool for the enhancement of non-specific plant pathogen resistance. Abstracts of the VI Ukrainian Congress for Cell Biology with International Representation, June 18-21 Yaremche. 2019, p. 124.

Buziashvili AY, Cherednichenko LM, Kropyvko SV, Yemets AI. Transgenic expression of human lactoferrin in potato plants enhance their resistance to fungal pathogens. Abstracts of the XVIII International Conference of Students and Young Scientists “Shevchenkivska vesna: Bioscience Advances”, May 2 Kyiv. 2020, p. 7-11

Бузіашвілі АЮ, Ємець АІ. Експресія лактоферину людини в трансгенних рослинах томатів та картоплі підвищує їх стійкість до фітопатогенів. Збірник тез доповідей V міжнародної наукової конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, 1-2 жовтня Дніпро. 2020, с. 63.

РОЗДІЛ 4

ОТРИМАННЯ ТА АНАЛІЗ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН *L. esculentum* З ГЕНОМ *hLf*

4.1. Введення в культуру *in vitro* та аналіз регенераційного потенціалу різних експлантів томатів сортів Перлина, Лагідний та Money Maker

Хоча минуло вже 30 років з часу публікації першого протоколу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації томатів, цей метод досі пов'язаний з певними складностями, основною серед яких є низька частота перенесення цільових генів в геном цієї рослини (Jeroen et al., 1993). Серед факторів, що впливають на ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації томатів, важливими є особливості генотипу, тип експланта, обраного для трансформації, та фітогормональний склад живильного середовища (Аветисян та Коломієць, 2013; Frary & Earle, 1996). Отже, перед проведенням генетичної трансформації досліджуваних сортів томатів генوم лактоферину додатково було проведено дослідження по введенню в культуру *in vitro* сортів томатів Лагідний і Перлина та оцінці їх морфогенетичного потенціалу у порівнянні з модельним сортом Money Maker, для якого протоколи маніпулювання *in vitro* та генетичної трансформації вже існують. У результаті було встановлено, що найбільш сприятливим для культивування *in vitro* та мікроклонального розмноження трьох досліджуваних сортів томатів є безгормональне живильне середовище МСТ (Рис. 4.1).

Також нами було досліджено вплив різних концентрацій та комбінацій фітогормонів на регенераційну здатність різних типів експлантів (сім'ядольних листків, гіпокотилів, листкових дисків та міжвузлів) томатів сортів Money Maker, Лагідний та Перлина. У результаті проведених досліджень для сортів Лагідний і Перлина було розроблено ефективні протоколи введення в культуру та мікроклонального розмноження рослин *in vitro*. При цьому було

встановлено, що регенераційний потенціал експлантів сорту Перлина був набагато нижчим порівняно з сортами Money Maker та Лагідний.



Рис. 4.1. Культивування проростків, міжвузлів та мікроклональне розмноження томату сорту Перлина на різних живильних середовищах: 1 – 10-добовий проросток на середовищі МС; 2 – 10-добовий проросток на середовищі МСТ; 3 – міжвузля із пагоном, який культивували протягом 2 тижнів на середовищі МСТ; 4 – міжвузля із пагоном, який культивували протягом 2 тижнів на середовищі МСТ10 у присутності 2 мг/л БАП та 0.2 мг/л НОК; 5 – рослини, які культивували на середовищі МС протягом 30 діб; 6 – рослини, які культивували на середовищі МСТ протягом 30 діб. Масштабна позначка: 1-4 – 0.5 см, 5-6 – 1.5 см.

З огляду на короткий період вегетації, який триває 60-65 діб з моменту висадження розсади, цей сорт схильний до ураження грибними та бактеріальними патогенами, пік розвитку яких припадає на вологий та теплий весняно-літній період (Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні на 2020 рік; <http://oranjereya.com.ua>). Оптимальний склад живильного середовища для прямої регенерації пагонів томату сорту Перлина визначали для 3 типів експлантів – сім'ядольних листків, гіпокотилів та

міжвузлів. Для цього експланти культивували протягом 30 днів на живильних середовищах МСТ1-10, склад яких описано в підрозділі 2.3.

В результаті дослідження щодо здатності до регенерації пагонів з різних типів експлантів томату Перлина, було виявлено, що культивування експлантів на живильних середовищах МСТ1-МСТ6, до складу яких входить ауксин індоліл-оцтова кислота (ІОК), призводило до їх побуріння через 14 діб, та повну загибель, зокрема сім'ядольних листків, через 30 діб культивування. На гіпокотиліях, які культивували протягом 30 діб на середовищах МСТ5 та МСТ6, утворювався калюс, однак регенерація пагонів була відсутня. При культивуванні гіпокотилів на середовищах МСТ1-МСТ4 протягом 4 тижнів, на них з'являлись зародки, які гинули на 5 тиждень культивування. При культивуванні сім'ядольних листків та гіпокотилів на середовищі МС, для експлантів обох типів було характерно інтенсивне утворення коренів, утворення білого калюсу та побуріння експлантів. При культивуванні сім'ядольних листків протягом 30 днів на середовищах МСТ7, МСТ9, які містили ауксин НОК, та на середовищі МСТ8, яке містило ауксин 2,4-Д, на сім'ядольних листках утворювався жовтий та зелений калюс, однак при цьому не спостерігали ані соматичного ембріогенезу, ані органогенезу на даних експлантах. Гіпокотилі, які культивували на середовищах МСТ7-МСТ9, змінювали колір на бурий через 14 діб та гинули через 30 діб.

Здатність до прямої регенерації міжвузлів, що містили бічні бруньки, досліджували на середовищах МС, МСТ та МСТ10. Протягом 14 діб культивування на середовищі МСТ10 на міжвузлях спостерігали інтенсивне утворення калюсу та появу проростків із дрібними листками блідо-зеленого кольору довжиною 5-10 мм (Рис. 4.1, 4), на середовищі МСТ на експлантах було відмічено появу коренів у нижній частині експлантів та проростків довжиною 10-20 мм, які мали добре розвинуті листки яскраво-зеленого кольору (Рис. 4.1, 3). Проростки було відділено від експлантів та перенесено на середовище МСТ для подальшого культивування та мікроклонального розмноження *in vitro*.

Отже, пряму регенерацію рослин сорту Перлина було отримано лише на міжвузлових експлантах, які містили латеральні бруньки, що і слід було очікувати при підборі оптимальних для цього процесу умов. В той же час індукції регенерації ані пагонів, ані рослин на листових дисках, а також на гіпокотиліях та сім'ядольних листках, які зазвичай використовують для генетичної трансформації, на протестованих середовищах не відбувалось, лише спостерігали утворення на них калюсу.

Оскільки за використання міжвузлів, як експлантів, ефективність трансформації томатів є низькою (Sherkar & Chavan, 2014), сорт Перлина не використовували у подальших дослідженнях. Таким чином, нами було введено томат сорту Перлина в культуру *in vitro* та підібрано найбільш сприятливі умови для мікроклонального розмноження рослин, що може бути використано в подальших практичних цілях при роботі з цим сортом, зокрема при його масовому розмноженні, оскільки він характеризується високою врожайністю.

Для дослідження регенераційного потенціалу томатів сортів Лагідний та Money Maker як експланти було використано сім'ядольні листки, гіпокотилі та листові диски. Після 5 тижнів культивування на безгормональному середовищі МСТ (контрольні зразки) на жодному із досліджених типів експлантів не спостерігали регенерацію пагонів або утворення коренів, лише відбувалося збільшення розмірів експлантів приблизно вдвічі та утворення білого калюсу (Рис. 4.2, Рис. 4.4). У результаті було виявлено, що найбільша частота регенерації пагонів (76%) для сорту Money Maker характерна для гіпокотилів на живильному середовищі МСТ1, яке містило 1 мг/л ІОК та 1 мг/л зеатину (Зеа) (Рис. 4.2, Рис. 4.3). Цей результат підтверджують інші дослідження, спрямовані на підбір умов для ефективної регенерації *in vitro* рослин томатів сорту Money Maker (Khan, et al., 2006; Chaudhry et al., 2010) – у цих роботах частота регенерації досягала значення 69% для гіпокотилів. Трохи нижчу частоту регенерації для томату сорту Money Maker (73%) було продемонстровано за використання як експлантів сім'ядольних листків при їх культивуванні на середовищі МСТ1 (Рис. 4.2, Рис. 4.3).

Загалом, на сім'ядольних листках томатів сорту Money Maker частота регенерації пагонів складала відповідно 73, 26, 36, 24, 21 та 0.5% на живильних середовищах МСТ1, МСТ2, МСТ3, МСТ4, МСТ5, МСТ6 (Рис. 4.3). Для гіпокотилів томатів Money Maker частота регенерації пагонів складала 76, 60, 17, 67, 38 та 20% на середовищах МСТ1, МСТ2, МСТ3, МСТ4, МСТ5, МСТ6, відповідно (Рис. 4.3).

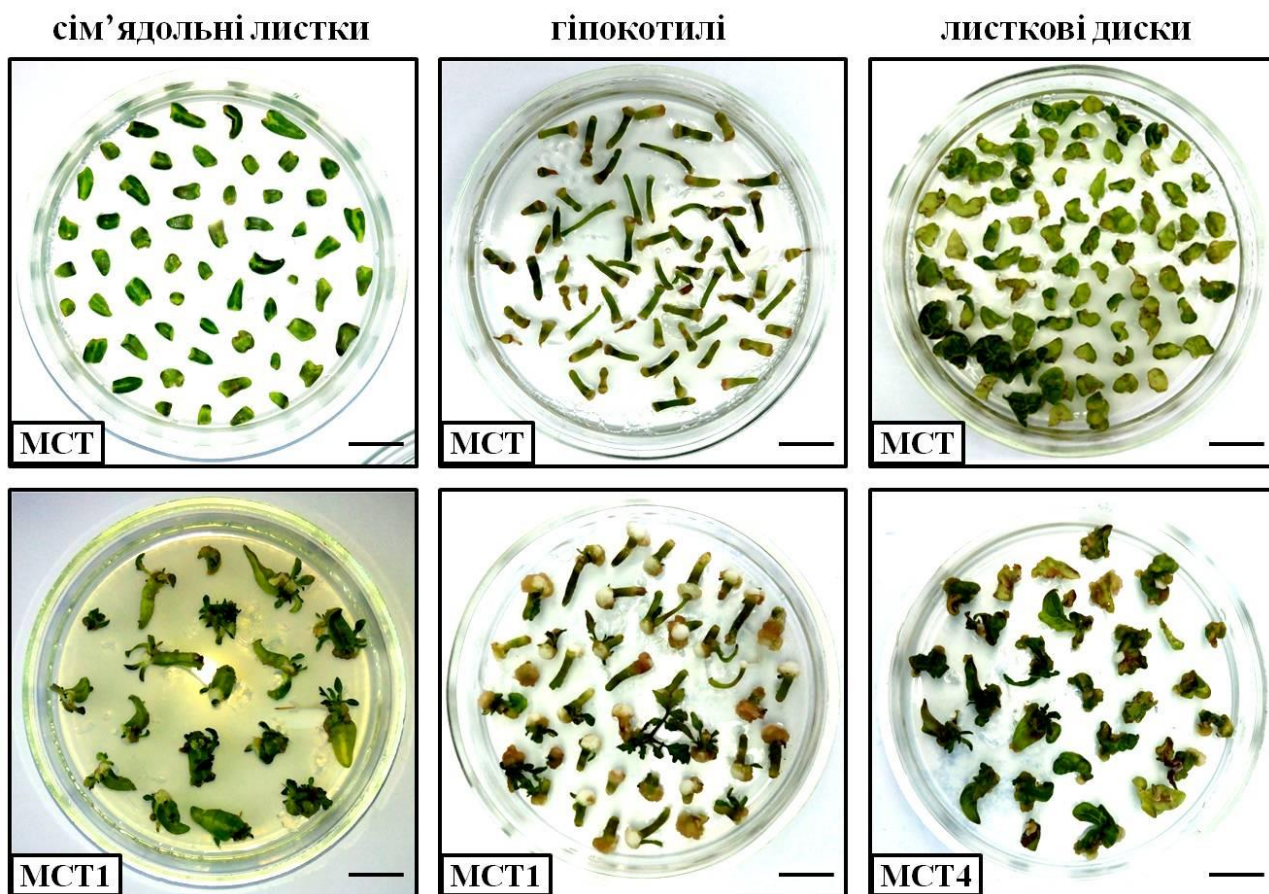


Рис. 4.2. Результати регенерації пагонів на експлантах *L. esculentum* сорту Money Maker через 5 тижнів культивування в умовах *in vitro* на живильних середовищах МСТ, МСТ1, що містило 1 мг/л Зеа, 1 мг/л ІОК, а також МСТ4, що містило 3 мг/л БАП, 0,1 мг/л ІОК. Масштабна позначка: 1,5 см.

Для листових дисків частота регенерації була нижчою порівняно з такими значеннями для гіпокотилів та сім'ядольних листків. У нашому дослідженні максимальна частота регенерації для листових дисків становила 18% при культивуванні на середовищі МСТ4 з додаванням 0.1 мг/л ІОК та 3 мг/л БАП

(Рис. 4.2 та 4.3). Цей результат відрізняється від отриманого у попередніх дослідженнях за використання аналогічних концентрацій фітогормонів та типів експлантів (Bříza et al., 2008) – у цій роботі частота регенерації листових дисків томатів Money Maker становила 67.3%. В іншій роботі (Sheng et al., 2015) вказані значення частоти регенерації рослин з гіпокотилів та сім'ядольних

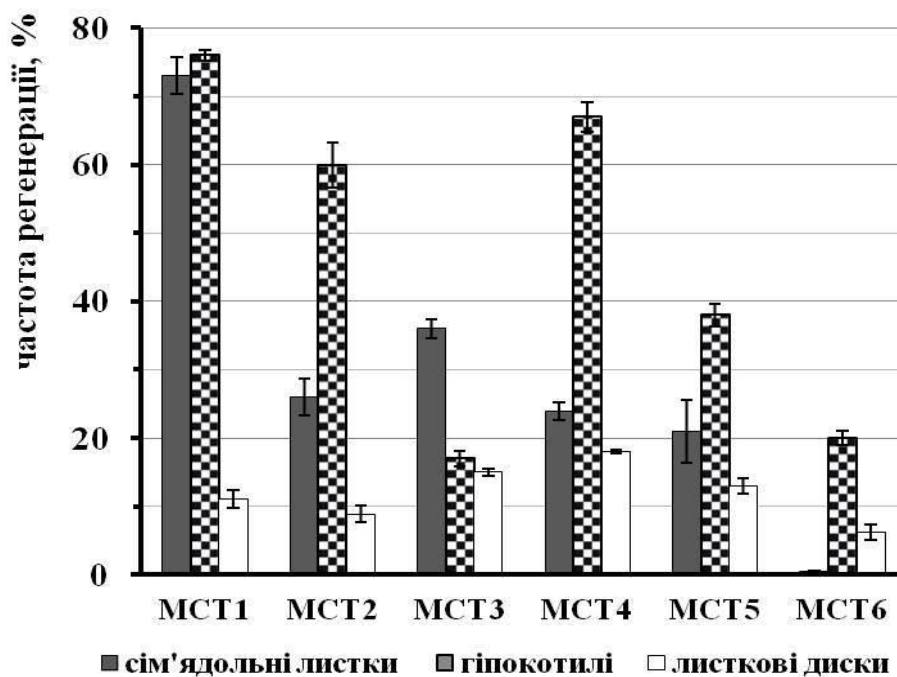


Рис. 4.3. Частота регенерації пагонів з різних типів експлантів томату сорту Money Maker на досліджуваних живильних середовищах.

листоків становили, відповідно, 70% та 68% при використанні комбінації фітогормонів, що співпадала із такою у середовищах MST5 та MST6 (0,5 мг/л ІОК, 2 мг/л БАП та 0,5 мг/л ІОК, 0,5 мг/л БАП). Ці значення є вищими за отримані у даному дослідженні, але у роботі (Sheng et al., 2015) було використано інший сорт томатів – Hezuo 908. Така різниця частоти регенерації різних сортів томатів на живильних середовищах однакового складу може бути пояснена іншими лабораторними умовами культивування цих сортів, а також залежністю від обраного генотипа.

Для сім'ядольних листків та гіпокотилів томатів сорту Лагідний частота регенерації через 35 діб культивування була дещо меншою, порівняно із сортом Money Maker, і за використання комбінації фітогормонів 1 мг/л ІОК та 1 мг/л Зеа, її максимальні показники склали, відповідно, 40 та 65% (Рис. 4.4 та 4.5).

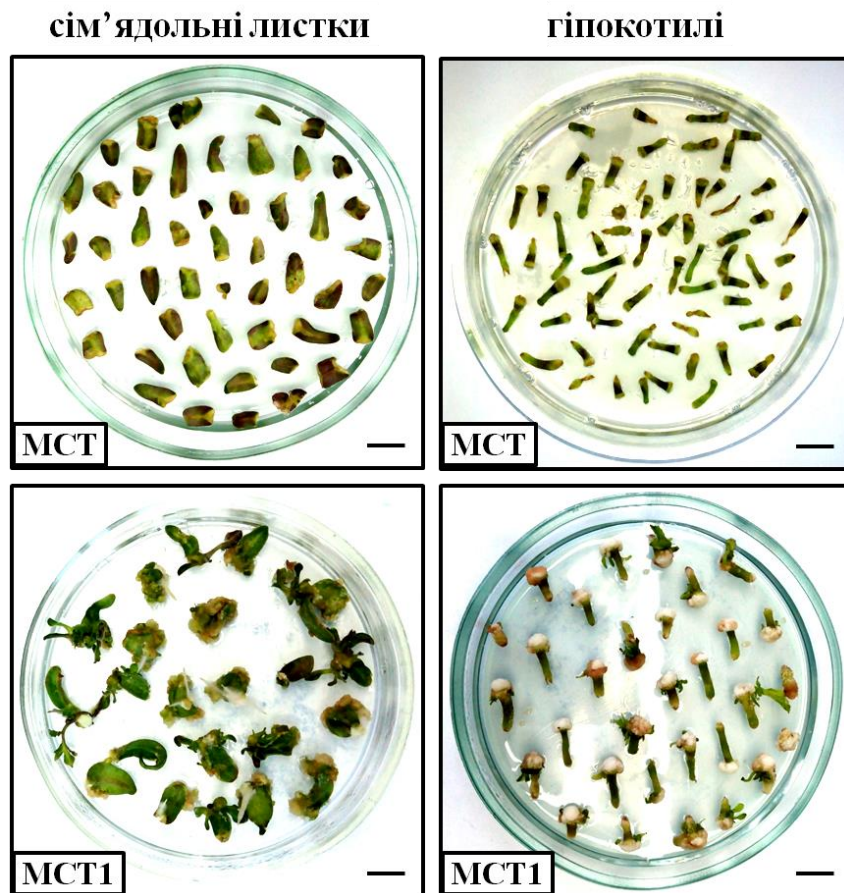


Рис. 4.4. Результати регенерації пагонів на живильному середовищі МСТ1, що містило 1 мг/л Зеа та 1 мг/л ІОК на різних типах експлантів *L. esculentum* сорту Лагідний через 5 тижнів культивування в умовах *in vitro*. Масштабна позначка: 1 см.

Загалом же, частота регенерації пагонів на сім'ядольних листках томату сорту Лагідний складала приблизно 40, 12, 21, 8, 3, 5% на середовищах МСТ1, МСТ2, МСТ3, МСТ4, МСТ5, МСТ6 (Рис. 4.5). На гіпокотиллях томату сорту Лагідний частота регенерації була приблизно 65, 30, 15, 33, 0,1 та 0,9% на середовищах МСТ1, МСТ2, МСТ3, МСТ4, МСТ5, МСТ6, відповідно (Рис. 4.5). Оскільки в інших дослідженнях для сім'ядольних листків томатів було

показано найвищий морфогенетичний потенціал в порівнянні із листковими дисками та гіпокотиллями (Gerszberg et al., 2015), в подальших дослідженнях

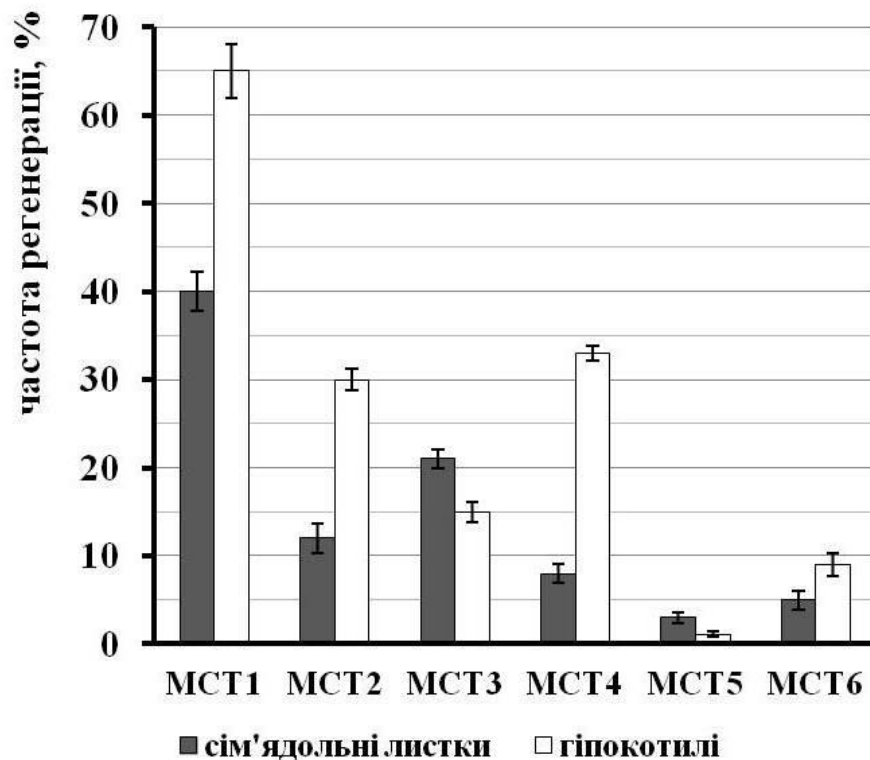


Рис. 4.5. Частота регенерації пагонів з різних типів експлантів томату сорту Лагідний на досліджуваних живильних середовищах.

для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації томатів було використано саме цей тип експлантів.

4.2. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація томатів, селекція та ПЛР-аналіз трансгенних ліній

Для генетичної трансформації томатів геном *hLf* використовували сорт Money Maker, як модельний сорт для досліджень з генетичної трансформації та фізіології томатів. Для даного сорту раніше вже було розроблено прості та ефективні методики трансформації (Jeroen et al., 1993; Frary & Earle, 1996; Chaudhry et al., 2010; Saker et al., 2011; Танасієнко та ін., 2014). Також, для

проведення дослідження було обрано український сорт Лагідний, який характеризується, як нами було встановлено, високим морфогенетичним потенціалом в культурі *in vitro*. Даний сорт було вперше використано для маніпуляцій *in vitro* та покращення його характеристик із застосуванням біотехнологічних методів. Вибір даного сорту обумовлений тим, що томат сорту Лагідний є стандартом врожайності та вмісту мікроелементів. Крім того, обидва сорти є ранньостиглими та чутливими до бактеріальних та грибних патогенів.

В нашому дослідженні із генетичної трансформації рослин томатів етап прекультивування використовували для зниження впливу стресу під час ізолювання експлантів – у попередніх дослідженнях було показано, що такий підхід підвищує частоту трансформації (Devi et al., 2012; Ma et al., 2015; Park et al., 2003). Далі, експланти інокулювали агробактерією, інокульовані експланти кокультивували на середовищі МСТ, яке не містило антибіотиків, для забезпечення адгезії бактеріальних клітин та активації *vir*-системи, яка відповідає за трансдукцію та інтеграцію Т-ДНК в геноми рослин – як повідомляють автори у роботах (El-Siddig et al., 2009; Jabeen et al., 2009; Sharma et al., 2009), цей етап важливий для підвищення ефективності трансформації.

Більше того, один із основних факторів, які впливають на частоту трансформації – це комбінація фітогормонів у селективному середовищі. Для селекції трансгенних рослин томатів, нами було використано середовище МСТ-С, доповнене 1 мг/л ІОК та 1 мг/л зеатину – було показано, що саме така комбінація ауксину та цитокініну сприяє високому рівню регенерації пагонів (90-100%) на сім'ядольних листках томатів (Khan et al., 2006; Chaudhry et al., 2010). Через 1 місяць селекції на експлантах утворювався ембріогенний калюс (Рис. 4.6, 1, 2). Протягом наступних 2 місяців на калюсі інтенсивно відбувалась регенерація пагонів (Рис. 4.6, 3, 4).

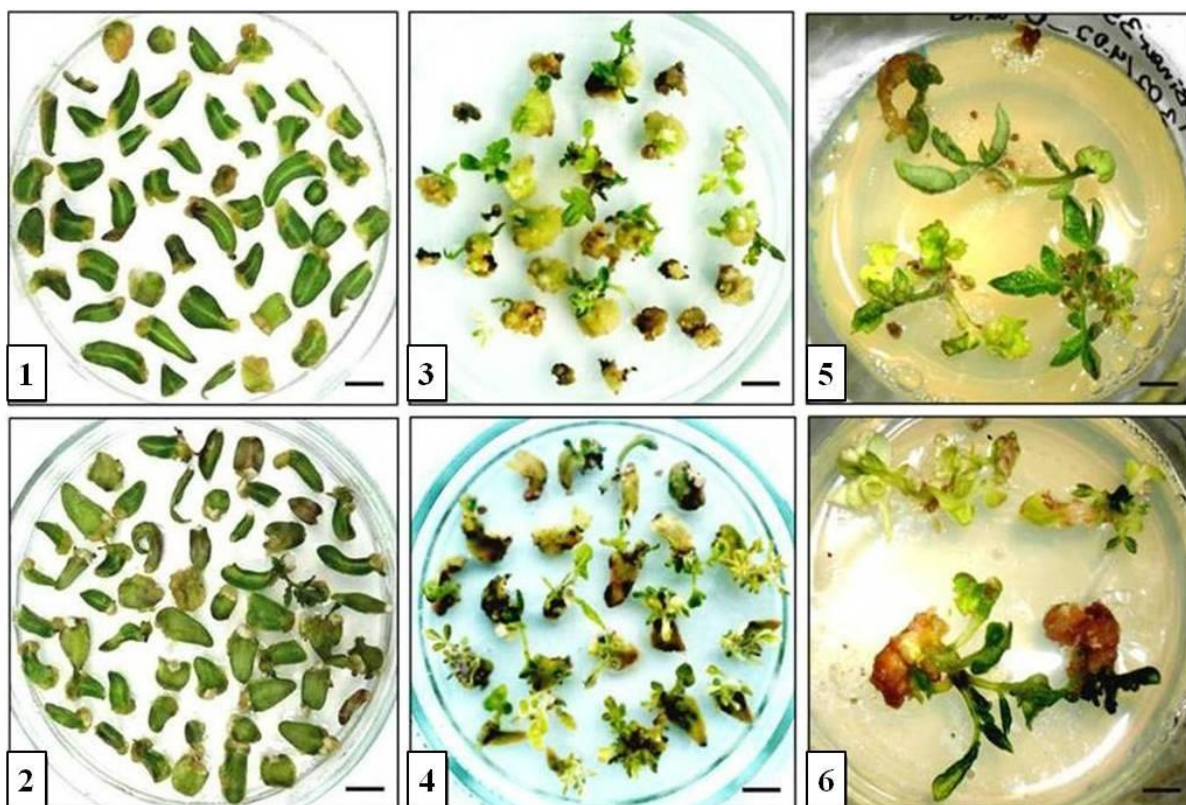


Рис. 4.6. Регенерація пагонів на експлантах томатів сортів Лагідний (1, 3, 5) та Money Maker (2, 4, 6) в умовах *in vitro* на селективному середовищі, що містило 100 мг/л канаміцину. Масштабна позначка: 1 см.

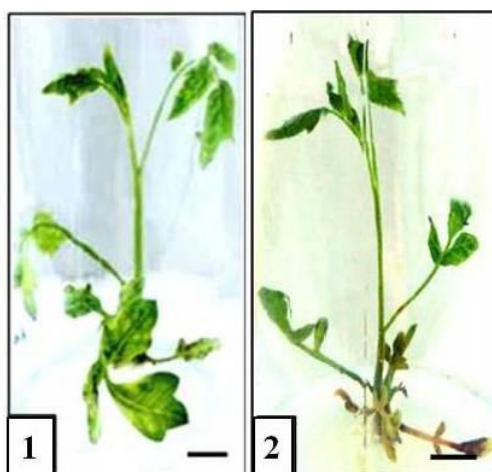


Рис. 4.7. Рослини томатів сортів Лагідний (1) та Money Maker (2) через 1 місяць культивування на середовищі МСТ-Р. Масштабна позначка: 1 см.

Через 3 місяці селекції експланти із регенованими пагонами висотою більше, ніж 2-3 см переносили у стерильний посуд для подальшої селекції, яку проводили протягом не менше 1 місяця для забезпечення стабільної інтеграції гена *hLf* в геномі ліній томатів (Рис. 4.6, 5, 6). Через 4 місяці селекції регеновані пагони відокремлювали від калюсу та переносили на середовище МСТ-Р для забезпечення відновлення рослин після селекції та для елімінації залишків клітин агробактерії (Рис. 4.7). Через 1 місяць культивування на середовищі МСТ-Р відібрані лінії мікроклонально розмножували на середовищі МСТ для їх подальшого аналізу за допомогою ПЛР, Вестерн блоттингу та біотестів.

В результаті ПЛР-аналізу, серед 35 відібраних ліній сорту Money Maker та 27 ліній сорту Лагідний, фрагмент гена *hLf* було виявлено лише в 1 лінії кожного сорту (Рис. 4.8).

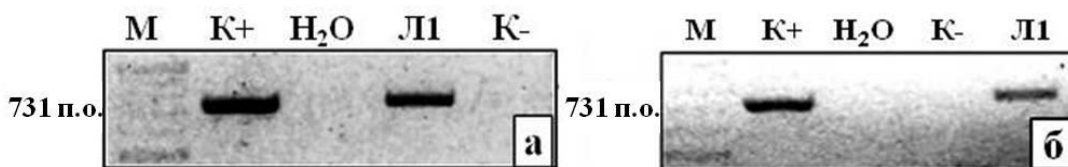


Рис. 4.8. Результати ПЛР-аналізу із праймерами, специфічними до *hLf*, для підтвердження інтеграції гена *hLf* в геномі трансгенних рослин томатів сортів Money Maker (а) та Лагідний (б): М – маркер довжин ДНК, К⁺ – позитивний контроль (плазміда pBin35LF), ампліфікований фрагмент – 731 п.о.; Н₂О – ампліфікація у відсутності ДНК (негативний контроль), К⁻ – нетрансгенні лінії, Л1 – трансформовані лінії.

Розмір продуктів ампліфікації у доріжках, які відповідали зразкам із геномною ДНК трансгенних ліній, відповідав очікуваному розміру 731 п.о., як і у контрольних зразках, в яких в якості матриці для ампліфікації було використано векторну конструкцію (pBin35LF) (Рис. 4.8). Продуктів

ампліфікації не було виявлено у зразках, які містили геномну ДНК контрольних рослин.

Отже, в нашому дослідженні частота трансформації через 3 місяці селекції для сорту Money Maker була на рівні 8,1%, для сорту Лагідний – 2,5%, в той час як ефективність трансформації для сорту Лагідний становила 3,7 % і була дещо вищою, ніж для сорту Money Maker (2,8 %) (Рис. 4.9). Такі значення ефективності трансформації томатів (2,8 та 3,7 %) аналогічні до результатів, отриманих іншими дослідниками (Jeroen et al., 1993; Frary & Earle, 1996; Břıza et al., 2008; El-Siddig et al., 2009; Jabeen et al., 2009; Sharma et al., 2009; Saker et al., 2011).

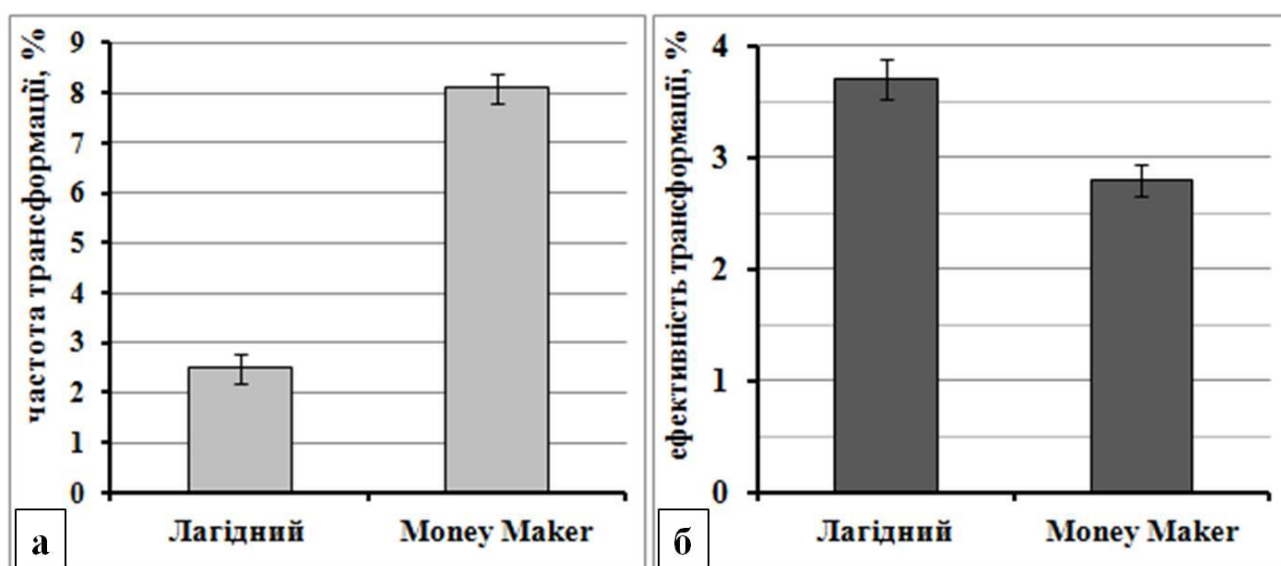


Рис. 4.9. Частота (а) та ефективність (б) трансформації томатів сортів Лагідний та Money Maker геном *hLf*.

Так, у дослідженні (Břıza et al., 2008) із генетичної трансформації томатів сорту Money Maker, частота трансформації становила 4,2% при селекції експлантів на середовищі, яке містило концентрацію фітогормонів, аналогічну такій у середовищі МСТ2 (1 мг/л Зеа та 0.1 мг/л ІОК), і це значення співставне з тим, що було отримано у нашому дослідженні.

Трансгенні рослини томатів сортів Лагідний та Money Maker, в яких було підтверджено експресію лактоферину, було адаптовано до умов *in vivo* (Рис. 4.10, 1) для вирощування в умовах закритого ґрунту та отримано насіння їх

першого покоління (F1) (Рис. 4.10, 2-7). Було встановлено, що морфологія трансгенних рослин сортів Money Maker та Лагідний в умовах *in vivo*, загалом, була подібною до такої у контрольних рослин (Рис. 4.10, а, б).

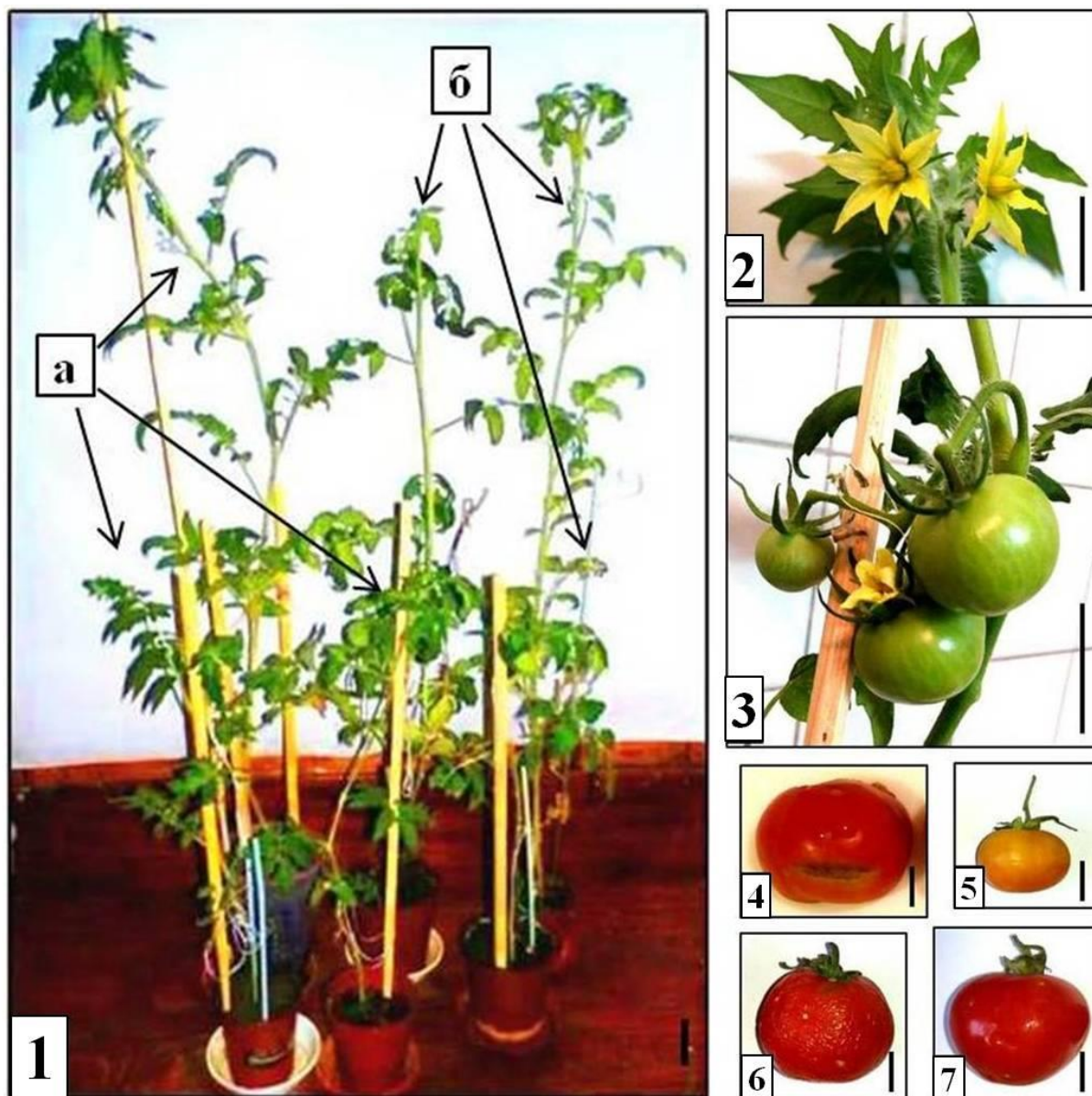


Рис. 4.10. Трансгенні (а) та контрольні (б) рослини томатів сорту Money Maker, адаптовані в умовах *in vivo* (1), квіти (2) та 30-добові плоди (3) трансгенної лінії томату сорту Money Maker, 60-добові плоди томату сорту Money Maker (4, 5) та Лагідний (6, 7). Масштабна позначка: 3 см (1), 1,5 см (2, 3), 1 см (4-7).

4.3. Аналіз трансгенних ліній томатів за допомогою Вестерн блоттингу

Експресію лактоферину людини в трансгенних лініях томатів підтверджували за допомогою Вестерн блот гібридизації. У результаті аналізу рекомбінантний лактоферин було виявлено в обох трансгенних лініях томатів, в яких було підтверджено інтеграцію гена *hLf* (L1 та L2), а також у позитивному контролі (бичачий лактоферин (K⁺)). Лактоферин не було виявлено у зразках, які містили тотальну фракцію білків контрольних (вихідних) рослин томатів сортів Лагідний та Money Maker (K1 та K2) (Рис. 4.11). Молекулярна маса білка, який виявили в результаті Вестерн блоту, була приблизно 80 кДа – така молекулярна маса характерна і для нативного лактоферину людини. Зразки, відповідно, вихідних нетрансформованих рослин томатів (негативний контроль) не дали реакції з антитілами до лактоферину людини.

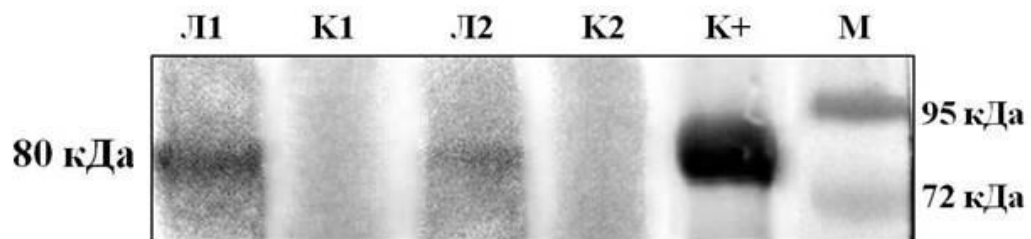


Рис. 4.11. Результати Вестерн блоттингу трансгенних ліній томатів сортів Лагідний та Money Maker за використання моноклональних антитіл проти лактоферину: L1 – трансгенна лінія сорту Лагідний, K1 – нетрансгенна лінія сорту Лагідний, L2 – трансгенна лінія сорту Money Maker, K2 – нетрансгенна лінія сорту Money Maker, K⁺ - бичачий лактоферин (позитивний контроль), M – маркер молекулярної маси білків.

За використання програми ImageLab™ 2.0, було проведено денситометричний аналіз інтенсивності хемілюмінесцентного сигналу та визначено кількість лактоферину у кожному із зразків. Було встановлено, що вміст лактоферину у трансгенних рослинах становив 0.04% від тотального розчинного білка (ТРБ)

(8.3 мкг/г тканини) для сорту Лагідний та 0.02% (4.8 мкг/г тканини) для сорту Money Maker. В попередніх дослідженнях з отримання трансгенних ліній люцерни, що експресують ген лактоферину людини, було показано нижчий рівень експресії лактоферину (0.0035% та 0.0047% від ТРБ) (Stefanova et al., 2013a), а в роботі (Chong & Langridge, 2000) повідомляють про експресію лактоферину в трансгенних рослинах картоплі на рівні 0.01% від ТРБ – такий рівень експресії співставний із результатами даної роботи.

4.4. Аналіз трансгенних ліній томатів за допомогою біотестів

4.4.1. Дослідження антибактеріального та фунгістатичного впливу зразків із трансгенних ліній томатів. Стійкість трансгенних ліній томатів до фітопатогенних бактерій *R. solanacearum* (штаму ATCC 11696) та *S. michiganensis* (Ac-1996) досліджували за використання тесту “дифузії в агар”. Зони інгібування росту було виявлено навколо дисків із зразками, ізольованими із трансгенних ліній томатів обох сортів. Більше того, було виявлено помітну кореляцію між інгібіторним ефектом на ріст бактерій та концентрацією лактоферину у зразках (Рис. 4.12, Рис. 4.13).

Для сорту Лагідний, розміри зон інгібування росту *R. solanacearum* були 11 ± 1 мм та *S. michiganensis* - 5 ± 1 мм (Рис. 4.12, 2, Рис. 4.13). Для зразків контрольних рослин сорту Лагідний, інгібіторного впливу на ріст *R. solanacearum* не було відмічено, але зона інгібування росту розміром 1 ± 0.5 мм була відмічена при тестуванні на *S. michiganensis*, що можна пояснити певним рівнем толерантності сорту Лагідний до *S. michiganensis* (Рис. 4.12, 1). Розміри зон затримки росту для позитивного контролю (комерційний лактоферин у концентрації 0.1 мг/мл) були 11 ± 1 при тестуванні на *R. solanacearum*, та 5 ± 1 мм на *S. michiganensis* для лактоферину у концентрації 2 мг/мл (Рис. 4.12, 3, Рис. 4.13). Для трансгенної лінії сорту Money Maker зони затримки росту були розміром 4 ± 1 мм при тестуванні на *R. solanacearum* та 2 ± 1 мм - на *S. michiganensis* (Рис. 4.12, 2, Рис. 4.13). Для зразків нетрансгенних рослин сорту

Money Maker, інгібіторного ефекту не спостерігали на ріст обох видів бактерій (Рис. 4.12, 1). Розміри зон інгібування росту *R. solanacearum* при використанні лактоферину у концентрації 0.05 мг/мл були 5 ± 1 мм, *C. michiganensis* – 3 ± 1 мм при використанні його в концентрації 0.8 мг/мл (Рис. 4.12, 3, Рис. 4.13).

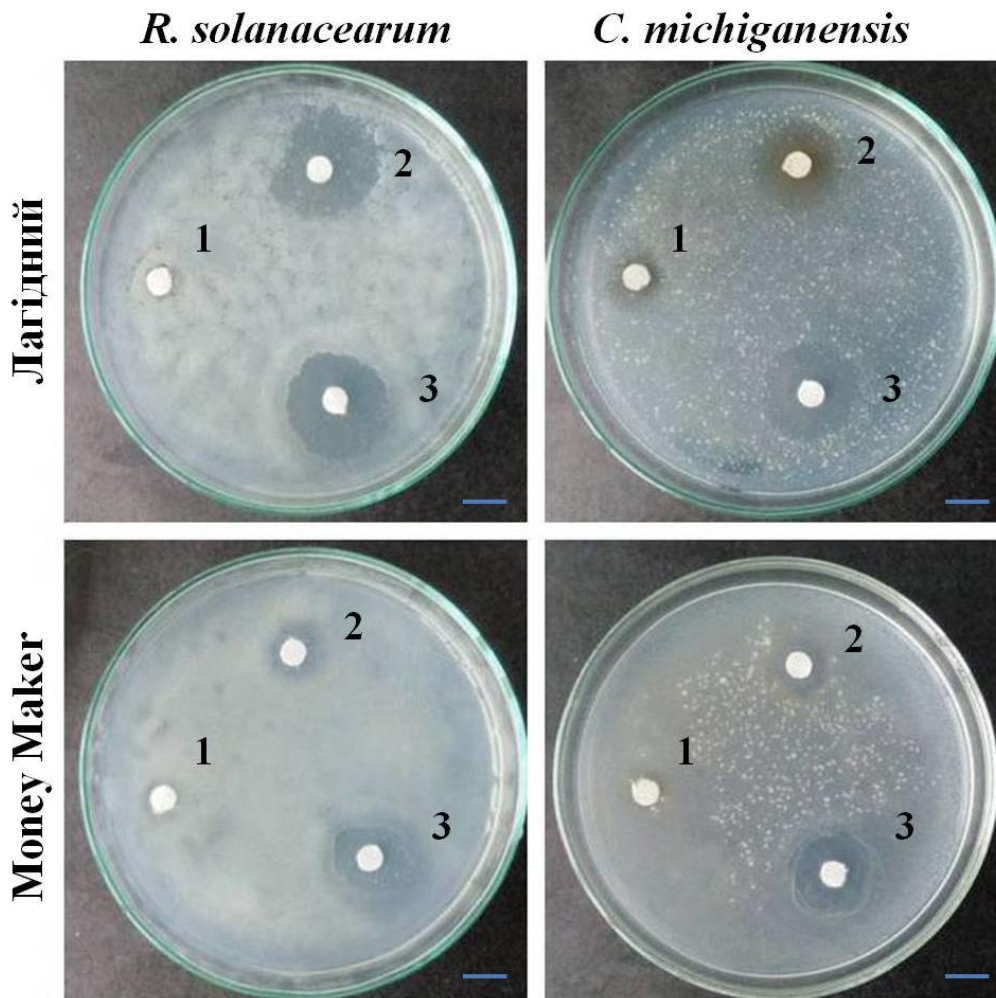


Рис. 4.12. Результати тестів “дифузії в агар”, які демонструють антибактеріальну активність зразків, ізольованих із трансгенних ліній томатів сортів Лагідний та Money Maker, проти *R. solanacearum* ATCC 11696 та *C. michiganensis* Ac-1996: 1 – зразки із нетрансформованих рослин, 2 – зразки із трансгенних ліній, які експресують лактоферин людини, 3 – комерційний лактоферин, нанесений на диски. Масштабна позначка: 1 см.

Декілька робіт було присвячено визначенню антибактеріальної активності лактоферину у трансгенних рослинах. В 1998 р. Zhang із співавторами (Zhang et

al., 1998) показали позитивну кореляцію між рівнем експресії лактоферину в рослинах тютюну та їх стійкістю до *R. solanacearum*; пізніше, в 2002, Lee із співавторами (Lee et al., 2002) повідомили про часткову стійкість до

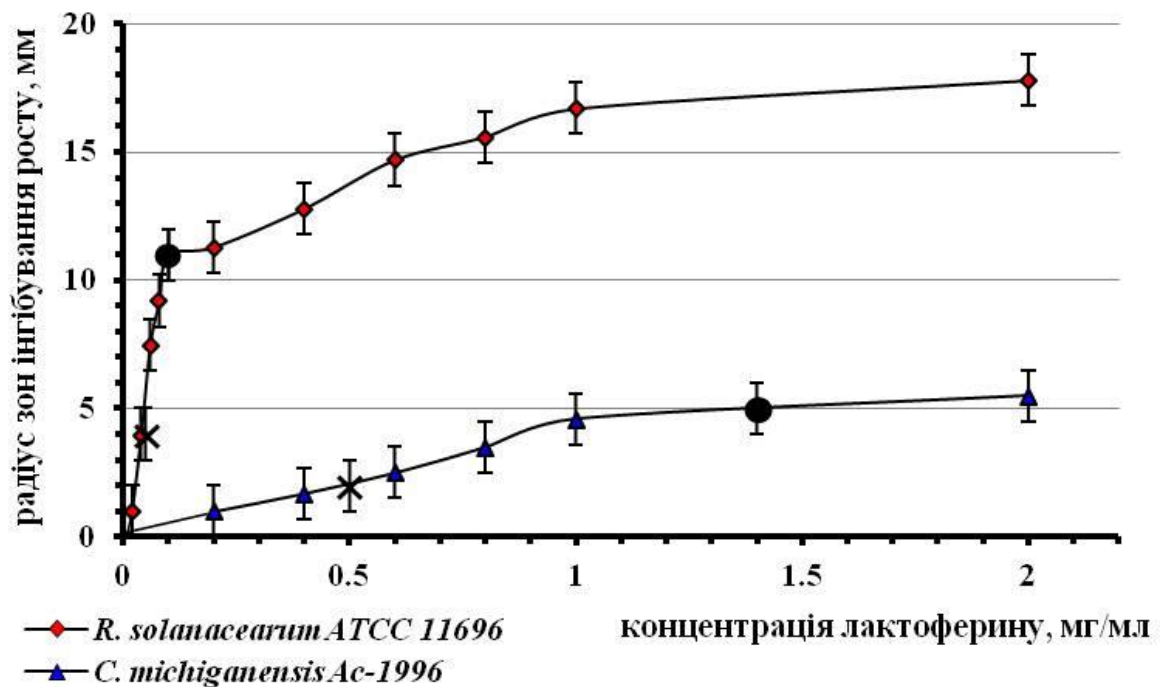


Рис. 4.13. Радіуси зон інгібування росту на *R. solanacearum* ATCC 11696 та *C. michiganensis* Ac-1996 після інкубування протягом 16 год із різними концентраціями лактоферину на дисках. Круглі точки відповідають радіусам зон інгібування росту для зразків із рослин сорту Лагідний, що експресують лактоферин, “X”-подібні точки – зразкам рослин трансгенної лінії сорту Money Maker.

R. solanacearum лінії томатів F7976-26, яка експресувала *hLf*; також, у 2013 р. було підтверджено стійкість до *C. michiganensis* рослин люцерни, що експресували *hLf* (Stefanova et al, 2013a).

Отже, нами встановлено антибактеріальну активність зразків трансгенних ліній томатів сортів Лагідний та Money Maker на високовірулентні бактеріальні патогени (*R. solanacearum* та *C. michiganensis*) за використання тесту “дифузії в агар”. Відповідно до наших підрахунків (за використання відсотка від тотального білка), кількість лактоферину в 20 мкл свіжоізольованих зразків

(соку рослин), нанесених на диски, становила близько 0,09-0,12 мг/мл для сорту Лагідний та 0,04-0,05 мг/мл для сорту Money Maker. Аналогічні значення відповідають кількості комерційного лактоферину у контрольних зразках

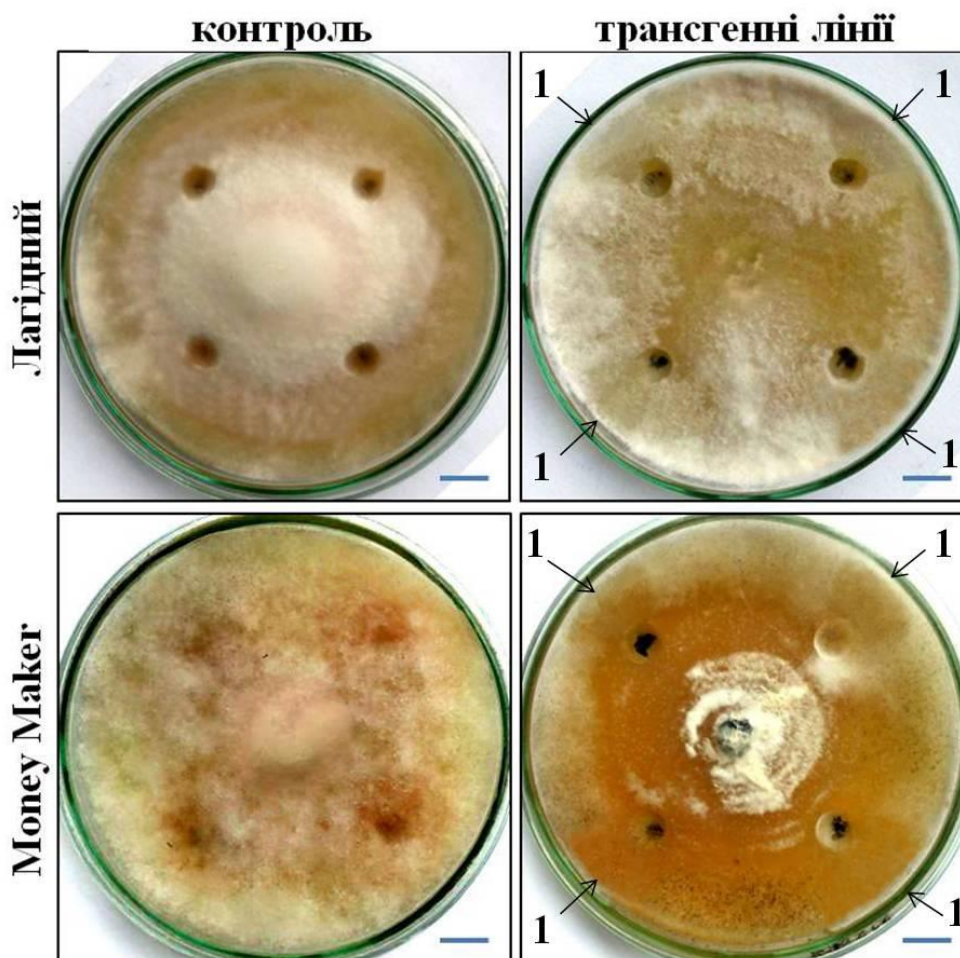


Рис. 4.14. Фунгістатичний ефект зразків, ізольованих з трансгенних ліній томатів сортів Лагідний та Money Maker, що експресують *hLf*, на культуру *P. infestans*: 1 – зони затримки росту. Масштабна позначка: 1 см.

(Рис. 4.12, 2, 3, Рис. 4.13). Отримані дані є результатом експресії лактоферина у досліджуваних трансгенних рослинах томатів.

Інгібіторний вплив зразків трансгенних ліній томатів на ріст культури *P. infestans* визначали також за допомогою тесту “дифузії в агар” (Рис. 4.14). Було показано, що зразки контрольних рослин суттєво не впливають на ріст культури, в той час як зразки з трансгенних рослин демонструють фунгістатичний ефект, який проявлявся у затримці росту міцелію та інгібуванні

утворення конідій (Рис. 4.14, 1). Раніше було виявлено фунгістатичний ефект лактоферину на міцеліальні та дріжджові гриби, що викликають хвороби людини та рослин (Muñoz & Marcos, 2006; Lahoz et al., 2008; Fernandes & Carter, 2017). Також було показано здатність тотальних білкових фракцій рослин, що експресують лактоферин, затримувати ріст інших видів фітопатогенних грибів (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum*) (Nguyen et al., 2011; Han et al., 2012). Нами вперше встановлено, що зразки трансгенних рослин томатів, що експресують лактоферин людини, проявляють фунгістатичний ефект, шляхом пригнічування росту міцелію *P. infestans*.

4.4.2. Аналіз стійкості до фітофторозу трансгенних ліній томатів. Для проведення даного аналізу 10 асептичних трансгенних та 10 контрольних рослин томатів сортів Money Maker та Лагідний заражали конідіями *P. infestans* в умовах *in vitro*. Динаміку розвитку симптомів спостерігали через 1, 4 та 8 днів після зараження, фіксуючи такі ознаки, як появу бурих некротичних плям, в'янення, наявність життєздатного міцелію. Через 24 год після зараження на трансгенних та контрольних рослинах не було виявлено симптомів фітофторозу (Рис. 4.15). На четвертий день після інокуляції, 5-10% листя трансгенних рослин були ушкодженими (Рис. 4.15), в той час як на контрольних лініях некротичні плями з'явилися на 30-50% листків (Рис. 4.15). На восьмий день після зараження близько 25% листків трансгенних рослин було ушкоджено (Рис. 4.15), тоді як симптоми фітофторозу на контрольних рослинах вкривали більше, ніж 75% їх поверхні, і біля основи стебла спостерігали інтенсивний ріст і розвиток міцелію (Рис. 4.15). Результати дослідження стійкості до фітофторозу трансгенних ліній томатів, що експресують *hLf*, були подібними для сорту Лагідний та Money Maker. Було виявлено, що трансгенні рослини мають підвищену стійкість до *P. infestans* у порівнянні із контрольними рослинами. Отже, рівень стійкості ліній томатів, що експресують *hLf*, відповідає 7 балам за 9-бальною шкалою, а стійкість контрольних ліній може бути оцінена на рівні 1 балу. Аналогічну методику зараження в умовах *in vitro* широко використовують для дослідження стійкості різних видів рослин, зокрема, томатів та картоплі, до бактеріальних та грибних патогенів (Bhagava

et al., 2007; Akhtar et al., 2016; Zuluaga et al., 2016; Vivianne et al., 1999; Huang et al., 2005; Zhang et al., 2014; Чередніченко, 2012, 2013). При цьому, у роботі (Vivianne et al., 1999; Vleeschouwers et al., 1999) було показано, що результати біотестів за використання методу зараження *in vitro* рослин та тканин відповідають результатам біотестів у польових умовах.

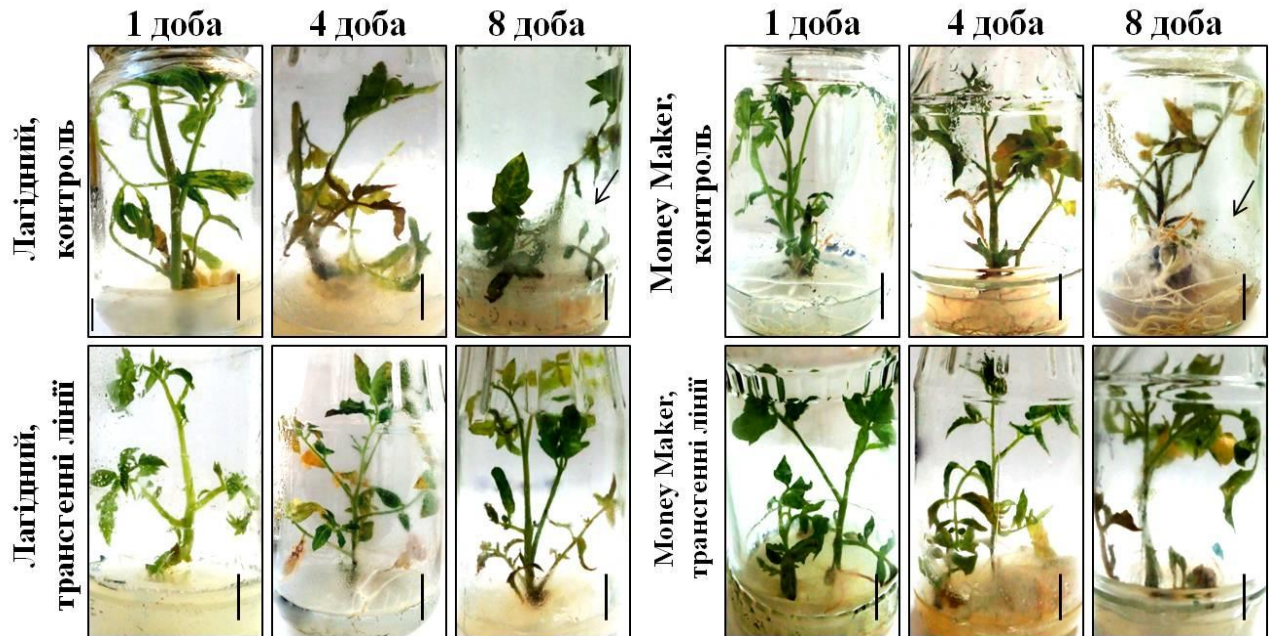


Рис. 4.15. Результати дослідження стійкості томатів сортів Лагідний та Money Maker до *P. infestans* в умовах *in vitro*. Стрілки вказують на міцелій *P. infestans*. Масштабна позначка: 1.5 см.

Також було проведено тест на стійкість до *P. infestans* відокремлених листків трансгенних та контрольних рослин томату в умовах *in vitro*. На 8 день після інокуляції на листках і контрольних, і трансгенних рослин спостерігали поодинокі плями некрозу. При цьому, на листках, на які наносили стерильну дистильовану воду, симптоми зараження були відсутні. Частота прояву симптомів фітофторозу на листках контрольних рослин томату сорту Лагідний становила 69%, Money Maker – 75%; на листках трансгенних рослин – 43% та 55% для сортів Лагідний та Money Maker, відповідно. Отже, результати зараження відокремлених листків, як і зараження цілих рослин вказують на підвищення стійкості трансгенних рослин томатів у порівнянні із нетрансформованими (Бузіашвілі та ін, 2020).

Таблиця 4.1

**Оцінка стійкості трансгенних та контрольних ліній томатів сортів
Лагідний та Money Maker до бактеріальних та грибних патогенів**

Рослини, сорт Патогени	Лагідний контроль	Лагідний трансгенні	Money Maker, контроль	Money Maker, трансгенні
<i>R. solanacearum</i>	-	+++	-	++
<i>C. michiganensis</i>	±	++	-	+
<i>P. infestans</i>	-	+	-	+

Рівень стійкості на основі результатів біотестів: для тесту дифузії в агар “-” – відсутність інгібування росту, “±” – зона інгібування росту розміром 1 мм, “+” – 2 мм, “++” – 4-5 мм, “+++” – 11 мм; для оцінки стійкості до *P. infestans* в умовах *in vitro* “-” – стійкість на рівні 1-2 балів за 9-бальною шкалою, “+” – стійкість на рівні 7 балів за 9-бальною шкалою.

Таким чином, в нашій роботі було показано, що експресія гена лактоферина людини в геномі картоплі сортів Вернісаж, Левада, Світанок Київський та Зарево, та томатів сортів Money Maker та Лагідний значно підвищує їх стійкість до бактеріальних (*C. michiganensis* та *R. solanacearum*) та грибних (*P. infestans*, *F. sambucinum*) патогенів. Отримані нами результати, як і результати наведених вище досліджень, вказують на перспективність застосування технологій переноса гена лактоферину для підвищення стійкості культурних рослин до фітопатогенів. (Табл. 4.1).

Результати досліджень, описані у даному розділі, опубліковані в наступних статтях та тезах:

Buziashvili AY, Cherednichenko LM, Kropyvko SV, Blume YB, Yemets AI. Transgenic tomato lines expressing human lactoferrin show increased resistance to

bacterial and fungal pathogens. *Biocatal. Agricult. Biotechnol.* 2020:25. (Q2). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101602>.

Бузіашвілі АЮ, Ємець АІ. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація українських сортів картоплі та томату геном лактоферину людини. Доповіді НАН України. 2018;10:88-94. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.10.088>.

Бузіашвілі А.Ю., Чередниченко Л.М., Кропивко С.В., Ємець А.І. Лінії томатів, які експресують ген лактоферину людини, характеризуються стійкістю до фітофторозу. Доповіді НАН України. 2020;5:95–102. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.05.095>.

Бузіашвілі АЮ, Ємець АІ. Аналіз впливу різних комбінацій регуляторів росту на регенерацію пагонів цінних сортів *Lycopersicon esculentum* Mill. в умовах *in vitro*. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2016;19:88–91.

Buziashvili AY, Yemets AI. *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato with human lactoferrin gene. Abstracts of the I International Conference for Young Scientists, September 21-25, Kyiv. 2015, p. 111.

Бузіашвілі АЮ, Ємець АІ. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація томата сорту Лагідний для підвищення його стійкості проти фітопатогенів. Збірник тез доповідей III Міжнародної наукової конференції молодих учених “Біологія рослин та біотехнологія”, 16-18 травня Київ. 2017, с. 63

Buziashvili A.Yu., Yemets A.I. Determination of the most favourable nutrient medium composition for *in vitro* cultivation and direct plantlet regeneration of tomato variety Perlyna. Abstracts of the XV International conference of students and young scientists “Shevchenkivska vesna: Bioscience Advances”, April 18-21 Kyiv. 2017, p. 9.

Buziashvili A.Yu., Yemets A.I. Establishment *in vitro* culture and plantlet regeneration of tomato cultivar Perlyna. Abstracts of the International conference of young scientists “Modern problems of Microbiology and Biotechnology”, June 20-24 Odesa. 2017, p. 11-17.

Buziashvili AY, Yemets AI. Obtaining of phytopathogen-resistant tomato and potato plants with human lactoferrin gene. Abstracts of the 4th International Symposium on Euroasian Biodiversity. July 3-6 Kyiv. 2018, p. 12.

Бузіашвілі АЮ, Ємець АІ. Антибактеріальна активність екстракту трансгенних рослин томату, що експресують ген лактоферину людини. Збірник тез доповідей V Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих вчених “Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології”, 7-8 листопада Вінниця. 2018, с. 73.

Yemets AI, **Buziashvili AY.** Lactoferrin expresson as a tool for the enhancement of non-specific plant pathogen resistance. Abstracts of the VI Ukrainian Congress for Cell Biology with International Representation, June 18-21 Yaremche. 2019, p. 124.

Buziashvili A.Yu., Cherednichenko L.M., Kropyvko S.V., Yemets A.I. Expression of human lactoferrin in transgenic tomato lines enhance their resistance to bacterial and fungal phytopathogens. Abstracts of the XIV All-Ukrainian conference of young scientists IMBG, 27-28 May Kyiv. 2020.

Бузіашвілі АЮ, Ємець АІ. Експресія лактоферину людини в трансгенних рослинах томатів та картоплі підвищує їх стійкість до фітопатогенів. Збірник тез доповідей V міжнародної наукової конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, 1-2 жовтня Дніпро. 2020, с. 63.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

На сьогоднішній день, одним із найбільш перспективних шляхів підвищення стійкості культурних рослин до фітопатогенів є застосування сучасних досягнень біотехнології рослин, зокрема, методів генетичної інженерії. Використання даних методів дозволяє здійснювати перенесення генів стійкості до різних фітопатогенів до геному цінних сортів рослин та їх експресію під контролем високоефективних промоторів. Серед генів стійкості до фітопатогенів, ген лактоферину є одним із найбільш перспективних з огляду на його антимікробну активність проти широкого спектру патогенних мікроорганізмів та низьку алергенність (Stefanova et al., 2008; Lakshman et al., 2013; Yemets et al., 2014). Лактоферин – це білок із родини трансферинів, який, окрім здатності зв'язувати та транспортувати йони заліза, володіє антибактеріальною, фунгіцидною, противірусною, та іншими корисними властивостями (Adleranova et al., 2008). Даний білок експресується здебільшого у ссавців та міститься у великій кількості у молоці, слині, сльозах, та інших секреторних рідинах. Серед рослин, трансфериноподібні (TF-like) білки були виявлені лише у деяких видів: *Chlorella variabilis*, *Selaginella moellendorffii*, *Glycine max*, *Theobroma cacao*, *Medicago truncatula* та *Citrus clementina* (Lina et al., 2016). В 2013 р. лактоферин було вперше виявлено у насінні лікарської рослини *Syzygium cumini* індійськими вченими (Binita et al., 2014). Протягом останніх 20 років було проведено ряд досліджень з отримання різних видів модельних, фармацевтичних та культурних рослин, які б експресували гени лактоферину, пептидів, отриманих з лактоферину та синтетичних химерних пептидів різного походження (тварин, людини). Трансгенні рослини створювали з метою перевірки їх на стійкість до фітопатогенів або для використання їх як продуцентів (біофабрик) рекомбінантного білка з фармакологічними властивостями, однак при цьому не контамінованого вірусами тварин (Stefanova et al., 2008; Lakshman et al., 2013; Yemets et al., 2014).

Лактоферин – це високонсервативний білок, який має молекулярну масу близько 70-80 кДа та складається приблизно із 700 амінокислотних залишків. Лактоферин людини складається із 2 субодиниць, кожна з яких, в свою чергу, складається із 2 долей (C та N). В кожній субодиниці є Fe^{3+} -зв'язуючий центр. Лактоферин людини має 3 сайти глікозилювання - Asn138, Asn479 та Asn624, при цьому, сайт Asn624, зазвичай, залишається неглікозильованим. Антимікробна активність лактоферину здійснюється за двома механізмами: 1) за рахунок конкурентного зв'язування йонів Fe^{3+} , які необхідні для росту та розвитку фітопатогенів, та 2) за рахунок специфічного зв'язування лактоферину із негативно зарядженими фосфоліпідами клітинних мембран бактерій та грибів, яке призводить до утворення пор. Противірусна активність лактоферину здійснюється за рахунок зв'язування із глікопротеїнами вірусних частинок, що перешкоджає їх проникненню всередину клітин (Bruni et al., 2016 Giansanti et al., 2016, Sinha et al, 2013). Отже, використання гена лактоферину для його експресії в культурних рослинах може позитивно впливати на здоров'я людини, оскільки рекомбінантний лактоферин здатний підвищити якість харчових продуктів та володіє імуномодулюючою та іншими, як зазначено вище, властивостями.

Серед овочевих культур, одними з найбільш важливих в раціоні людини є томат (*Lycopersicon esculentum*), а також, для певної категорії населення, картопля (*Solanum tuberosum*). Однак, їх вирощування пов'язане із небезпекою зараження бактеріальними та грибними фітопатогенами, які знатні спричинити значні збитки врожаю (30-80%). Обидві культури є чутливими до ураження фітопатогенами, специфічними до представників родини Пасльонові. Багато цінних сортів томатів та картоплі, придатних для вирощування на території України, є чутливими до хвороб, особливо, ранньостиглі та пізньостиглі сорти, вегетація яких відбувається у вологий весняний та осінній період, сприятливий для розвитку бактеріальних та грибних інфекцій (Шотик та ін., 2014; Чередниченко, 2012, 2013). Серед бактеріальних патогенів, найбільш небезпечними для томатів та картоплі є *Clavibacter michiganensis* subsp.

michiganensis (збудник бактеріального раку томатів), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (що викликає кільцеву гниль картоплі) та *Ralstonia solanacearum*, що спричиняє бактеріальне в'янення томатів та буру гниль картоплі. Серед грибних патогенів, найбільш небезпечним та шкодочинним є ооміцет *Phytophthora infestans*, збудник фітофторозу томатів та картоплі. Не менш шкідливими для картоплі є грибні патогени роду *Fusarium*, які викликають суху гниль картоплі. На території України, *C. michiganensis* та *P. infestans* здатні ушкоджувати до 90% врожаю томатів та картоплі, і в останні 10 років площі заражених територій зростають. Щодо *R. solanacearum* – даний мікроорганізм є карантинним, і протягом останніх 15 років на території України не виявлено очагів зараження даним фітопатогеном, тому у випадку завезення зараженого насінневого матеріалу є небезпека виникнення епіфітотії. Отже, проблема захисту томатів та картоплі від бактеріальних та грибних патогенів є актуальною на сьогоднішній день (Kolomiets et al., 2019a; Тимошук, 2013; Бородай та Парфенюк, 2018; Грицай та Варбанець, 2012).

Тому, метою роботи було отримання генетично модифікованих ліній рослин картоплі та томатів з геном лактоферину людини (*hLf*) та дослідження їх стійкості до збудників бактеріальних та грибних хвороб. Нами було використано перспективні високоврожайні сорти томатів, придатні для вирощування на території України. А саме, було використано британський середньоранній сорт Money Maker із індетермінантним типом росту, як модельний сорт, для якого розроблено високоефективні методики *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, ранньостиглий детермінантний сорт Лагідний, який є українським сортом-стандартом врожайності та вмісту поживних речовин, та український індетермінантний ранньостиглий сорт Перлина. Зазначені сорти томатів є чутливими до хвороб. Також, були використані сорти картоплі української селекції Вернісаж, Левада (столового призначення), Світанок Київський (універсальний) та Зарево (технічний сорт) – зазначені сорти характеризуються помірною стійкістю до хвороб.

Оскільки одним із факторів, який найбільше впливає на ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, є склад селективного середовища (Vinterhalter et al., 2008; Gerszberg et al., 2015), перед проведенням трансформації обраних сортів томатів геном лактоферину було проаналізовано вплив різних комбінацій фітогормонів у складі живильного середовища на ефективність регенерації різних типів експлантів томатів. Було виявлено, що на середовищі МСТ, доповненому 1 мг/л зеатину та 1 мг/л ІОК, регенерація гіпокотилів та сім'ядольних листків томатів відбувається із найбільш високою ефективністю, яка становить 65 та 40% для сорту Лагідний, 76 та 73% - для сорту Money Maker, відповідно. Оскільки сорт Перлина в культурі *in vitro* продемонстрував низький морфогенетичний потенціал, на відміну від сорту Лагідний і Money Maker, було вирішено не використовувати його в подальших дослідях по генетичній трансформації геном лактоферину.

Наступним етапом дослідження було проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації зазначених сортів томатів та картоплі геном лактоферину людини. Трансформацію здійснювали за використання супервірулентного штаму *A. tumefaciens* ЕНА105, що ніс плазмідну векторну конструкцію pBin35LF. В ній ген *hLf* знаходився під контролем конститутивного 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV35S) та термінатору нопалінсинтетази (*nosT*). Також, вектор містив ген неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*), яка забезпечує стійкість до канаміцину, тому селекцію трансгенних ліній томатів та картоплі здійснювали у присутності 100 мг/л канаміцину. В результаті селекції було відібрано стійкі до канаміцину лінії томатів та картоплі: 35 ліній томату сорту Money Maker, 27 ліній томату сорту Лагідний, а також 44 лінії картоплі сорту Вернісаж, 26 ліній сорту Левада, 25 ліній сорту Світанок Київський та 16 ліній сорту Зарево. Частота трансформації за результатами селекції становила: 8,1% для томатів сорту Money Maker та 2,5% дсорту Лагідний, а також 24,2, 30,2, 24,5 та 18,5% для картоплі сортів Вернісаж, Левада, Світанок Київський та Зарево,

відповідно. Такі значення частоти трансформації є співставними із результатами інших досліджень.

Для підтвердження інтеграції гена *hLf* у геноми відібраних ліній, проводили ПЛР-аналіз із праймерами, специфічними до гена лактоферину. В результаті ПЛР-аналізу фрагмент гена *hLf* було виявлено в 1 лінії кожного сорту томату та картоплі. Ефективність трансформації томатів становила 2,8 та 3,7% для сортів Money Maker та Лагідний, ефективність трансформації картоплі була на рівні 6,8, 3,8, 4 та 6,25% для сортів Вернісаж, Левада, Світанок Київський та Зарево, відповідно. Такі значення ефективності трансформації картоплі та томатів відповідають даним, отриманим в інших подібних роботах по трансформації цих рослин.

Для підтвердження експресії лактоферину в трансгенних лініях проводили Вестерн блот гібридизацію зразків (тотальної білкової фракції) трансгенних та контрольних рослин із використанням специфічних моноклональних антитіл до лактоферину. Лактоферин було виявлено у всіх досліджуваних трансгенних лініях, в контрольних лініях лактоферин не було ідентифіковано. За допомогою денситометричного аналізу, було визначено вміст лактоферину у трансгенних рослинах томатів, він був на рівні 0,02 та 0,04% від тотального розчинного білка (8,3 та 4,8 мкг/г тканини) для томатів сортів Money Maker та Лагідний. Вміст лактоферину в трансгенних лініях картоплі, зокрема, для сорту Зарево становив близько 0,05% від загальної кількості тотального розчинного білка (ТРБ). В інших трансгенних лініях картоплі сортів Вернісаж, Левада та Світанок Київський вміст лактоферину був аналогічний (на рівні 0,04-0.05% від ТРБ).

Трансгенні лінії, в яких було підтверджено експресію лактоферину, мікроклонально розмножували для подальших біотестів на стійкість до фітопатогенів та успішно адаптували *in vivo* в умовах теплиці. Бактерицидний вплив соку трансгенних рослин томатів та картоплі на бактерії *R. solanacearum* (ATCC 11696), *S. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Ac-1996) та *S. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Ac-1995) підтверджували за використання

методу “дифузії в агар”. В результаті було відмічено зони затримки росту бактерій навколо дисків, на які наносили сік трансгенних рослин томатів та картоплі. Розмір зон затримки росту біля дисків, на які наносили сік трансгенних рослин томатів, був аналогічний до розміру зон затримки росту біля дисків, на які наносили комерційний лактоферин у кількості, що відповідає кількості лактоферину у зразках соку трансгенних рослин, яку обраховували за використання денситометрії. Наявність зон затримки росту навколо дисків, на які наносили сік трансгенних рослин, є результатом експресії лактоферину.

Фунгістатичний вплив соку трансгенних рослин було досліджено із застосуванням тесту “дифузії в агар”. Навколо лунок в живильному середовищі, в які вносили сік трансгенних рослин томатів та картоплі, було виявлено затримку росту міцелію та інгібування утворення конідій *P. infestans* та *F. sambucinum*, тоді як навколо лунок, в які вносили сік нетрансгенних рослин, не спостерігали фунгістатичного впливу на міцелій та на конідії фітопатогенних грибів.

Стійкість ліній томатів та картоплі до фітофторозу, ліній картоплі до фузаріозу визначали за використання зараження *in vitro* асептичних рослин конідіями грибів. Було встановлено підвищення стійкості трансгенних ліній томатів та картоплі до *P. infestans* з 1 до 7 балів, ліній картоплі до *F. sambucinum* – з 2 до 7 балів за 9-бальною шкалою в порівнянні із нетрансгенними рослинами. Результати зараження відокремлених листків томатів конідіями *P. infestans* вказують на зниження частоти прояву симптомів фітофторозу на листках трансгенних рослин у порівнянні із нетрансгенними (з 69% до 43% для сорту Лагідний та з 75% до 55% - для сорту Money Maker – 75%), що також свідчить про підвищення стійкості до фітофторозу трансгенних рослин томатів, що експресують лактоферин.

Отже, в даній роботі було здійснено перенос гена лактоферину людини в геном двох сортів томатів (Money Maker та Лагідний) та 4 сортів картоплі (Вернісаж, Світанок Київський, Левада та Зарево) та отримано трансгенні лінії цих рослин, що експресують *hLf*. Встановлено антибактеріальний та

фунгістатичний вплив зразків соку, отриманого з тканин трансгенних ліній картоплі та томатів, зокрема на бактеріальні патогени *R. solanacearum* (ATCC 11696), *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Ac-1996), *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Ac-1995) та грибний патоген *P. infestans*, а також на *F. sambucinum* (F-52211) у випадку трансгенних ліній картоплі. Виявлено, що інгібіторний вплив зразків соку трансгенних рослин на досліджувані фітопатогени був подібним до впливу комерційного лактоферину у таких же концентраціях, що були визначені і в зразках трансгенних ліній. У результаті зараження трансгенних рослин та листків томатів сортів Money Maker та Лагідний конідіями *P. infestans*, а також трансгенних рослин картоплі сорту Зарево конідіями *P. infestans* та *F. sambucinum* в умовах *in vitro* встановлено підвищення стійкості трансгенних рослин томатів та картоплі до фітофторозу і рослин картоплі до фузаріозу.

Отримані результати вказують на те, що використання генетичної трансформації рослин геном лактоферину людини є перспективним підходом до підвищення стійкості цінних сортів рослин до широкого спектру бактеріальних та грибних фітопатогенів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі встановлено, що перенесення гена лактоферину людини в рослини картоплі та томатів за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації з подальшою інтеграцією цього гена в геном та його експресією в отриманих трансгенних лініях призводить до прояву ними антибактеріальної і фунгістатичної активності до ряду фітопатогенних бактерій та грибів.

1. Встановлено, що на живильному середовищі МСТ, доповненому зеатином (1 мг/л) та ІОК (1 мг/л), ефективність регенерації пагонів томатів сортів Money Maker та Лагідний є максимальною та становить 40 та 65% для гіпокотилів та сім'ядольних листків томату сорту Лагідний, і 73 та 76% для гіпокотилів та сім'ядольних листків томату сорту Money Maker.

2. У результаті *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації отримано трансгенні лінії томатів та картоплі, при цьому частота трансформації томатів становила 8,1% для сорту Money Maker, 2,5% для сорту Лагідний, частота трансформації картоплі - 24,2, 30,2, 24,5 та 18,5% для сортів Вернісаж, Левада, Світанок Київський та Зарево, відповідно.

3. За результатами ПЛР-аналізу підтверджено трансгенну природу відібраних ліній картоплі та томатів і встановлено, що ефективність трансформації становила: для томатів – 2,8% для сорту Money Maker та 3,7% для сорту Лагідний, для картоплі – 6,8, 3,8, 4 та 6,25% для сортів Вернісаж, Левада, Світанок Київський та Зарево.

4. За використання Вестерн блоту підтверджено наявність рекомбінантного лактоферину людини в досліджуваних трансгенних лініях томатів та картоплі та визначено його вміст на рівні 0,04% та 0,02% від тотального розчинного білка для томатів сортів Лагідний та Money Maker, та на рівні 0,05% для трансгенних ліній картоплі, зокрема, сорту Зарево.

5. Встановлено антибактеріальний та фунгістатичний вплив зразків соку, отриманого з тканин трансгенних ліній картоплі та томатів, зокрема на бактеріальні патогени *R. solanacearum* (ATCC 11696), *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Ac-1996), *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Ac-1995) та грибний патоген *P. infestans*, а також на *F. sambucinum* (F-52211) у випадку трансгенних ліній картоплі.

6. Встановлено, що інгібіторний вплив зразків соку трансгенних рослин на досліджувані фітопатогени був подібним до впливу комерційного лактоферину у таких же концентраціях, що були визначені і в зразках трансгенних рослин.

7. У результаті зараження трансгенних рослин та листків томатів сортів Money Maker та Лагідний конідіями *P. infestans*, а також трансгенних рослин картоплі сорту Зарево конідіями *P. infestans* та *F. sambucinum* в умовах *in vitro* встановлено підвищення стійкості трансгенних рослин томатів та картоплі до фітофторозу і рослин картоплі до фузаріозу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Аветисян ЮФ, Коломієць ЮВ, Григорюк ІІ. Створення томатів, стійких до бактеріальних хвороб, шляхом клітинної селекції. Продовольча індустрія АПК. 2014;2:32-36.
2. Аветисян ЮФ, Коломієць ЮВ. Індукція утворення калюсних клітин культурою помідора (*Lycopersicon esculentum* Mill.) в умовах *in vitro*. Наук. доп. Нац. унів. біорес. і природокор. Укр. 2013;5.
3. Бабаянц ОВ, Неплій ЛВ, Гораш АФ, Терновий КІ. Хімічний захист картоплі від фітофтори (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) у південному Степу України. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія : Агронія і біологія. 2014;3:37-40.
4. Бородай ВВ, Парфенюк АІ. Поширеність та розвиток основних хвороб картоплі (*Solanum tuberosum* L.) в Україні. Агроекологічний журнал. 2018;4:82-87.
5. Бузіашвілі АЮ, Ємець АІ. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація картоплі геном лактоферину людини. Факт. експ. евол. орг. 2019;25:184-189.
6. Бузіашвілі АЮ, Ємець АІ. Аналіз впливу різних комбінацій регуляторів росту на регенерацію пагонів цінних сортів *Lycopersicon esculentum* Mill. в умовах *in vitro*. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2016;19:88–91.
7. Бузіашвілі АЮ, Ємець АІ. Отримання ліній рослин картоплі та томатів з геном лактоферину людини. Доповіді НАН України. 2018;10:88-94.
8. Ващишин ОА, Добровецька МР. Вплив стійкості сорту на ураження картоплі фітофторозом. Передгірне та гірське землеробство і тваринництво. 2016;60:20-32.
9. Воробйова НВ. Роль і значення сорту у формуванні урожаю картоплі ранньостиглої в правобережному Лісостепу України. Новітні агротехнології. 2013;1(1):97-104.

10. Гвоздяк РІ, Мороз СМ, Яковлева ЛМ, Черненко ЄП. Етіологія масового захворювання томатів у господарствах України. Мікробіологічний журнал. 2009;71(5):33-40.
11. Гвоздяк РІ, Яковлева ЛМ, Черненко ЄП, Мороз СМ. Взаємовідношення між збудниками бактеріозів томатів. Вісник ДАУ. 2005;2(15):168-173.
12. Голячук ЮС. Джерела інфекції фітофторозу картоплі в умовах Західного Лісостепу України. Картоплярство. 2012;41:55-63.
13. Грицай РВ, Варбанець ЛД. *Ralstonia solanacearum*: особливості біології і ідентифікації. Мікробіологія і біотехнологія. 2012;3(19):6-16.
14. Державна установа “Тернопільська обласна фітосанітарна лабораторія”. Кільцева гниль картоплі *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. (Інтернет). Доступно: http://www.karantin.te.ua/userfiles/file/ohlyad_poshyrennya_karantynnykh_orhanizmiv/potato.pdf
15. Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні на 2020 рік (Інтернет). Київ: Міністерство аграрної політики та продовольства України; 2020 (оновлено 2020 Чер 4; цитовано 2020 Лип 22). Доступно: <https://sops.gov.ua/reestr-sortiv-roslin/>
16. Жук ВП, Олійник ТМ, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Регенерація українських сортів картоплі та їх генетична трансформація синтетичними CRУ-генами. Сб. научн. трудов Никит. бот. сада. 2009;131:197-201.
17. Завірюха П, Панасюк О, Коновалюк М, Неживий З. Формування селекційно цінних ознак гібридними сіянцями картоплі F1. Вісник Львівського національного аграрного університету. 2014;18:128-136.
18. Завірюха ПД. Селекція картоплі у Львівському НАУ: результати і перспективи. Вісник Житомирського національного агроєкологічного університету. 2015;2(1):215-222.
19. Коломієць ЮВ. Бактеріальні хвороби томатів. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017;20:207-210.
20. Коломієць ЮВ, Аветисян ЮФ. Етіологія бактеріальних хвороб томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.) у господарствах Дніпропетровської області. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і

- природокористування України. Серія : Біологія, біотехнологія, екологія. 2014;204:132-136.
21. Коломієць ЮВ, Григорюк ІІ, Буценко ЛМ. Діагностика бактеріальних хвороб рослин помідорів в умовах відкритого і закритого ґрунту України. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2016;7(64).
 22. Литвак ІІ, Левченко ВВ. Оцінка патогенності штамів збудника *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicum* на районованих та перспективних сортозразках картоплі Полісся України. Вісник ДАУ. 2002;1:62-67.
 23. Логоша Р.В. Світовий ринок овочів та місце на ньому України. Серія: Економічні науки. 2012;3:164-169.
 24. Люта ЮО, Кобиліна НО. Оцінка перспективних ліній томата селекції Інститут зрошуваного землеробства НААН. Овочівництво і баштанництво. 2014;60:175-183.
 25. Мазоренко Д.І., Мазнев Г.Є. (ред.) Томати: прогресивні технології та нормативи витрат Науково-виробниче видання. Харків: Вид-во “Міськдрук”, 2011. 51 с.
 26. Мельник СІ, Ковчі АЛ, Стефківська ЮЛ, Кравчук ОО, Горицька ТВ. Функціонування ринку картоплі в Україні Сортівивч. та охор. прав на сорти росл. 2017;13(2):206–210.
 27. Мельничук ФС, Воєводін ВВ, Демчинська МІ, Карбованець ОІ, Ничипорук ОМ. Біологічні особливості стійкості сортів картоплі проти збудників бактеріозів. Карантин і захист рослин. 2014;6:14-16.
 28. Могільнікова ІВ, Циганкова ВА, Соломянний РМ, Броварець ВС, Білько НМ, Ємець АІ. Скринінг рістстимулювальної активності синтетичних сполук — похідних піримідину. Допов. Нац. акад. наук Укр. 2020;10:62-70.
 29. Новак ІМ. Аналіз стану та перспектив розвитку зовнішньоекономічної торгівлі овочами закритого ґрунту у світі. Вісн. Харк. нац. техн. ун-ту сільського господарства. Сер. “Економічні науки”. Вип. 113. Харків: ХНТУСГ; 2011. 505 с.

30. Остренко МВ, Демкович ЯБ, Верменко ЮЯ. Споживча та лікувальна цінність різних сортів картоплі. Таврійський науковий вісник. 2012;82: 99-110.
31. Подгорский ВС, Коцофляк ОИ, Киприанова ЕА, Гвоздяк ОР. (редакторы) Украинская коллекция микроорганизмов. Каталог культур. 2 изд. Киев: Наукова. думка, 2007. 270 с.
32. Про внесення змін до Переліку регульованих шкідливих організмів. Редакція наказу Міністерства аграрної політики та продовольства України, липень 16, 2019 № 397.
33. Саблука ПТ, Мазоренко ДІ, Мазнева ГЄ, редактори. Технології та нормативи витрат на вирощування овочевих культур. Київ: ННЦ ІАЕ; 2009. 340 с.
34. Сергієнко ВГ. Фунгіцидний контроль основних хвороб томата. Овочівництво і баштанництво. 2012;58:314-324.
35. Скрипник НВ. Пошук джерел стійкості томатів проти збудника фітофторозу. Карантин і захист рослин. 2013;8:9-10.
36. Скрипник НВ. Структура популяції збудника фітофторозу томатів. Захист і карантин рослин. 2012;58:214-219.
37. Строяновський ВС. Формування продуктивності картоплі різних груп стиглості залежно від способів садіння в Лісостепу Західному (дисертація). Кам'янець-Подільський: Поділ. держ. агр-техн. ун-т; 2016. 214 с.
38. Танасієнко ІВ, Бузіашвілі А, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Агробактеріальна трансформація томатів (*Solanum lycopersicon*) геном лактоферину людини. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2014;15:246-250.
39. Тарасенко ОО, Чечітко ІП. Оцінка складових генофонду картоплі за перспективністю виділення джерел стійкості проти сухої фузаріозної гнилі. Наук. допов. НАУ. 2006;1(2):1-9.
40. Терьохіна ЛА. Поновлення сортових ресурсів в овочівництві. Овочівництво і баштанництво. 2012;58: 365-369.

41. Тимощук ОА. Збудники сухої гнилі бульб картоплі у зоні Полісся України. Наукові читання: наук.-теорет. зб. ЖНАЕУ. Т. 1. Житомир: ЖНАЕУ, 2013. С. 230–233.
42. Ткачик СО. (редактор). Методика проведення фітопатологічних досліджень за штучного зараження рослин. Київ: Нілан-ЛТД, 2014. 76 с.
43. Федорчук СВ. Вплив хімічних препаратів, біологічних і регуляторів росту на розвиток збудників *Alternaria solani* та *Phytophthora infestans*. Таврійський науковий вісник 2017;98:128-133.
44. Циганкова ВА, Андрусевич ЯВ, Білявська ЛО, Козирицька ВЄ, Іутинська ГО, Галкін АП, Галаган ТО, Болтовська ОВ. Рістстимулюючі, фунгіцидні і нематицидні властивості нових субстанцій мікробного походження та їх вплив на синтез малих si/miРНК в клітинах рослин. Мікробіол. Журн. 2012;74(6):36-45.
45. Чередниченко ЛМ. Оцінка надземної частини рослин селекційного матеріалу картоплі за стійкістю проти альтернаріозу на природному інфекційному фоні. Картоплярство України. 2012;3-4:5-7.
46. Чередниченко ЛМ. Оцінка селекційного матеріалу картоплі за стійкістю надземної частини рослин проти фітофторозу з використанням відокремлених частинок листків. Картоплярство України. 2013;1-2:19-24
47. Шотик МВ, Кубрак СМ, Яременко СС. Селекція на шкідливість до *Alternaria solani* (Ell. et Mart) Neerg на помідорах в умовах Київської області. Агробіологія. 2014;2:78-80.
48. Шуста ВМ, Марочко ВП, Ільчук ЮР, Ільчук РВ, Демкович ЯБ, Недільська УІ. Відтворення оригінального насіння та еліти сортів картоплі в умовах гірської зони Карпат. Передгірне та гірське землеробство і тваринництво. 2012;54(1):79-83.
49. Яновський ЮП, Балабак АФ. Вирощування помідора розсадним і безрозсадним способами у відкритому ґрунті (Інтернет). Умань: Редакційно-видавничий відділ Уманського НУС; 2013 (оновлено 2013 Лют 20; цитовано 2020 Лип 22). Доступно: <https://ovochi.udau.edu.ua/assets/files/rekomendacii.-pomidor.pdf>

50. Abdallah FB, El Hage Chahine JM. Transferrins: iron release from lactoferrin. *J. Mol. Biol.* 2000;303:255-266.
51. Abdelbacki AM, Taha SH, Sitohy MZ, Dawood AIA, Hamid MMA, Rezk AA. Inhibition of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) using whey proteins. *Virology Jour.* 2010;7.
52. Adleranova L, Bartoskova A, Faldyna M. Lactoferrin: a review. *Vet. Med.* 2008;53: 457-468.
53. Agarwal S, Rao AV. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ*, 2000 Sep 19;163(6):739-744.
54. Agrios GN. *Plant Pathology*. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.
55. Ahn M-J, Bae J-M, Lee S-W. Development of transgenic potato with high content of functional carotenoids by using metabolic engineering. *J. Plant Biotechnol.* 2010; 37:388–393.
56. Akhtar KP, Saleem MY, Iqbal Q, Asghar M, Hameed A, Sarwar N. Evaluation of tomato genotypes for late blight resistance using low tunnel assay. *J. Plant Pathol.* 2016;98(3):421-428.
57. Ali A, Muzaffar A, Awan MF, Din S, Nasir IA, Husnain T. Genetically Modified Foods: Engineered tomato with extra advantages. *Adv. life Sci.* 2014;1(3):139-152.
58. Ali I, Khan MS, Mustafa G, Sultan N, Iqbal Z, Shafiq M. Chapter 4. Resistance strategies against microbial plant pathogens. In: *Current Research in Microbiology*. Publisher: Open access ebooks, 2018. p. 1-23.
59. Alimohammadi M, Bagherieh-Najjar M. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: basic principles and influencing factors. *African J. Biotechnol.* 2009;8(20):5142–5148.
60. Amiri AN, Bakhsh A. An effective pest management approach in potato to combat insect pests and herbicide. *Biotechnol.* 2019;9:16.
61. Anderssona M, Turessona H, Olssona N, Fälta A-S, Ohlssona P, Gonzalezb MN, Samuelssond M, Hofvandera P. Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. *Physiol. Plantarum.* 2018;164:378–384.

62. Bhargava A, Osusky M, Forward BS, Hancock RE, Kay WW, Santosh M. Expression of a polyphemusin variant in transgenic tobacco confers resistance against plant pathogenic bacteria, fungi and a virus. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2007;88:301–312
63. Arie T, Takahashi H, Kodama M, Teraoka T. Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. *Plant Biotechnol.* 2007;24:135–147.
64. Bakhsh A. Development of efficient, reproducible and stable *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of five potato cultivars. *Food Technol. Biotechnol.* 2020;58(1):57-63.
65. Bakhsh A, Anayol E, Ozcan S. Comparison of transformation efficiency of five *Agrobacterium tumefaciens* strains in *Nicotiana tabacum* L. *Emirates J. Food Agricult.* 2014;26(3):259-264.
66. Baturó-Ciesniewska A, Lenc L, Grabowski A, Lukanowski A. Characteristics of Polish isolates of *Fusarium sambucinum*: molecular identification, pathogenicity, diversity and reaction to control agents. *Amer. Jour. Potato Res.* 2015;92:49-61.
67. Beals KA. Potatoes, Nutrition and Health. *Amer. J. Potato Res.* 2019;96:102-110.
68. Bennett RM, Bagby GC, Davis J. Calcium-dependent polymerization of lactoferrin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981;101, 88–95.
69. Benton JJ. *Tomato plant culture: in the field, greenhouse, and home garden.* 2nd ed. New York: CRC Press; 2007. 420 p.
70. Berlutti F, Pantanella F, Natalizi T, Frioni A, Paesano R, Polimeni A, Valenti P. Antiviral properties of lactoferrin-a natural immunity molecule. *Molecules.* 2011;16:6992–7018.
71. Bethell DR, Huang J. Recombinant human lactoferrin treatment for global health issues: iron deficiency and acute diarrhea. *Biometals.* 2004;17:337-342.
72. Bidabadi SS, Jain SM. Cellular, molecular, and physiological aspects of *in vitro* plant regeneration. *Plants (Basel).* 2020;9(6):702.
73. Binita, K., Kumar, S., Sharma, V.K., Sharma, V., Yadav, S., Proteomic identification of *Syzygium cumini* seed extracts by MALDI-TOF/MS. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2014;172:2091–2105.

74. Bisognin DA, Douches DS, Jastrzebski K, Kirk WW. Half-sib progeny evaluation and selection of potatoes resistant to the US8 genotype of *Phytophthora infestans* from crosses between resistant and susceptible parents. *Euphytica*. 2002;125:129-138.
75. Blancard D, Laterrot H, Marchoux G, Candresse Th. *Tomato Diseases Identification, Biology and Control: A Color Handbook*. 2nd ed. London: Manson Publ. Ltd; 2012. 688 p.
76. Boddy L. Pathogens of autotrophs. In: Watkinson SC, Money N, Boddy L, editors. *The Fungi*, 3rd ed. Academic Press; 2016. 466 p.
77. Boschi F, Schwartzman C, Murchio S, Ferreira V, Siri MI, Galván GA, Smoker, M, Stransfeld L, Zipfel C, Vilaró FL, Dalla-Rizza M. Enhanced bacterial wilt resistance in potato through expression of *Arabidopsis* EFR and introgression of quantitative resistance from *Solanum commersonii*. *Front. Plant Sci*. 2017;8:1642.
78. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 1976;72:248-254.
79. Bříza J, Pavingerová D, Přikrylová P, Gazdová J, Vlasák J, Niedermeierová H. Use of phosphomannose isomerase-based selection system for *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato and potato. *Biol. Plant*. 2008;52(3):453-461.
80. Broad RC, Bonneau JP, Hellens RP, Johnson AT. Manipulation of ascorbate biosynthetic, recycling, and regulatory pathways for improved abiotic stress tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci*. 2020;21:1790.
81. Bruce MA, Rupp JLS. *Agrobacterium*-Mediated Transformation of *Solanum tuberosum* L. *Potato Methods Mol. Biol*. 2019;1864:203-223.
82. Bruce TJ. GM as a route for delivery of sustainable crop protection. *J. Exp. Bot*. 2012;63:537-541.
83. Bruni N, Capucchio MT, Biasibetti E, Pessione E, Cirrincione S, Giraud L, Corona A, Dosio F. Antimicrobial activity of lactoferrin-related peptides and applications in human and veterinary medicine. *Molecules*. 2016;21.

84. Burger A, Eichenlaub R. Genetics of phytopathogenic bacteria. In: Esser K., Lüttge U., Beyschlag W., Hellwig F., editors. Progress in Botany. vol 64. Heidelberg: Springer; 2003. 536 p.
85. Buziashvili A, Cherednichenko L, Kropyvko S, Yemets A. Transgenic tomato lines expressing human lactoferrin show increased resistance to bacterial and fungal pathogens. Biocat. Agric. Biotechnol. 2020b;25.
86. Buziashvili AY, Cherednichenko LM, Kropyvko SV, Blume YB, Yemets AI. Obtaining transgenic potato plants expressing the human lactoferrin gene and analysis of their resistance to phytopathogens. Cytol. Genet. 2020a;54(3):179-188.
87. Ceasar SA, Ignacimuthu S. Genetic engineering of crop plants for fungal resistance: role of antifungal genes. Biotechnol. Lett. 2012;34:995-1002.
88. Chahardoli M, Fazeli A, Niazi A, Ghabooli M. Recombinant expression of LFchimera antimicrobial peptide in a plant-based expression system and its antimicrobial activity against clinical and phytopathogenic bacteria. Biotechnol. Biotechn. Equipm. 2018;32(3):714-723.
89. Chahardoli M, Fazeli A, Ghabooli M. Recombinant production of bovine Lactoferrin-derived antimicrobial peptide in tobacco hairy roots expression system. Plant Physiol Biochem. 2017;123:414-421.
90. Chahardoli M, Farzaneh A, Sohrabi A. Expression of recombinant Arabian camel lactoferricin-related peptide in *Pichia pastoris* and its antimicrobial identification. J. Sci. Food Agric. 2015;96:569-575.
91. Chakravarty B, Wang-Pruski G, Flinn B, Gustafson V, Regan S. Genetic transformation in potato: approaches and strategies. Amer. Jour. Potato Res. 2007;84:301-311.
92. Chaudhry Z, Abbas S, Yasmin A, Rashid H. Tissue culture studies in tomato (*Lycopersicon esculentum*) var. Moneymaker. Pak. J. Bot. 2010;42(1):155-163.
93. Chong DK, Langridge WH. Expression of full-length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants. Transgenic Res. 2000;9(1):71-78.
94. Chuntale K. Biotechnological approaches to improve potato: review article. J. Nat. Sci. Res. 2018;8(11):81-89.

95. Cocaliadis MF, Fernández-Muñoz R, Pons C, Orzaez D, Granell A. Increasing tomato fruit quality by enhancing fruit chloroplast function. A double-edged sword? *J. Experiment.* 2014;(65)16:4589–4598.
96. Conesa C, Calvo M, Sánchez L. Recombinant human lactoferrin: a valuable protein for pharmaceutical products and functional foods. *Biotechnol Adv.* 2010;28:831-838.
97. Craze M, Bates R, Bowden S, Wallington EJ. Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of potato (*Solanum tuberosum*) and production of transgenic microtubers. *Curr. Protocols Plant Biol.* 2018;3(1):33-41.
98. Crisp P, Wicks TJ, Troup G, Scott ES. Mode of action of milk and whey in the control of grapevine powdery mildew *Austr. Plant Pathol.* 2006;35:487-493.
99. Dahal K, Li X-Q, Tai H, Creelman A, Bizimungu B. Improving potato stress tolerance and tuber yield under a climate change scenario – a current overview. *Front. Plant Sci.* 2019;10:563.
100. Dahleen LS, Okubara PA, Blechl AE. Transgenic approaches to combat *Fusarium* head blight in wheat and barley. *Crop Sci.* 2001;41:628-637.
101. Dangol SD, Barakate A, Stephens J, Çalıskan ME, Bakhsh A. Genome editing of potato using CRISPR technologies: current development and future prospective. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 2019;139:403-416.
102. Dangol SD, Naeem M, Hussein AM, Yasmeen A, Emin MC, Bakhsh A. Genetic engineering of *Solanum tuberosum* L. to enhance resistance against abiotic stresses: a review. *JOJ Sci.* 2018;1(5):81-91.
103. Davies HV. Advances in potato improvement through genetic engineering. *Dev. Plant Genet. Breed.* 2000;5:154-158.
104. De Lepeleire J, Strobbe S, Verstraete J, Blancquaert D, Ambach L, Visser RGF, Stove C, van der Straeten D. Folate biofortification of potato by tuber-specific expression of four folate biosynthesis genes. *Mol. Plant.* 2018;11:175–188.
105. De Steur H, Van Loo EJ, Maes J, Gheysen G, Verbeke W. Farmers' willingness to adopt late blight-resistant genetically modified potatoes. *Agronomy.* 2019;9:280.

106. Desjardins AE, Hohn TM, van Middlesworth FL. Survey of *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*) for mating type, trichothecene production and other selected trait. *Phytopathol.* 1991;81(11):1452-1458.
107. Devi R, Dhaliwal MS, Gosal SS. A simple and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. *Veget. Sci.* 2012;39:113-117.
108. Dolatabadi B, Ranjbar G, Tohidfar M, Dehestani A. Genetic transformation of tomato with three pathogenesis-related protein genes for increased resistance to *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. *Jour. Plant Mol. Breed.* 2014;2(1):1-11.
109. Dominguez P, Gomez I, Barbero M, Fellmann T, Chatzopoulos T, Jensen H, Philippidis G. EU commodity market development: medium-term agricultural outlook, Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2018. 125 p.
110. Douches DS, Kirk WW, Jastrzebski K, Long C, Hammerschmidt R. Susceptibility of potato varieties and advanced breeding lines (*Solanum tuberosum* L.) to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in greenhouse screenings. *Amer. Pot. J.* 1997;74:75-86.
111. Dweba CC, Figlan S, Shimelis HA, Motaunga TE, Sydenhama S, Mwadzingeni L, Tsilo TJ. Fusarium head blight of wheat: pathogenesis and control strategies. *Crop Protect.* 2017;91:114-122.
112. Elansky SN, Pobedinskaya MA, Kokaeva LY, Statsyuk NV, Dyakov YT. *Phytophthora infestans* populations from the European part of Russia: genotypic structure and metalaxyl resistance. *J Plant Pathol.* 2015;97(3):449-456.
113. Crowell EF, McGrath JM, Douches DS. Accumulation of vitamin E in potato (*Solanum tuberosum*) tubers Transgenic Res. 2008;17(2):205-217.
114. El-Siddig MA, El-Hussein AA, Siddig MAM, Elballa MMA, Saker MM. *Agrobacterium*-mediated transformation and *in vitro* regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants cv. Castlerock. *J. Genet. Eng. Biotech.* 2009;7:11-17.
115. Ercolano MR, Sanseverino W, Carli PF, Ferriello F, Frusciante L. Genetic and genomic approaches for R-gene mediated disease resistance in tomato: retrospects and prospects. *Plant Cell Rep.* 2012;31:973–985.

116. Fehér, A., Felföldi, K., Preiszner, J. Dudits D. PEG-mediated transformation of leaf protoplasts of *Solanum tuberosum* L. cultivars. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 1991;27:105–114.
117. Fentik DA. Review on genetics and breeding of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Adv. Crop Sci. Tech.* 2017;5(5):306.
118. Fernandes KE, Carter DA. The antifungal activity of lactoferrin and its derived peptides: mechanisms of action and synergy with drugs against fungal pathogens. *Front. Microbiol.* 2017;8.
119. Fiers M, Edel-Hermann V, Chatot C, Hingrat Y, Alabouvette C, Steinberg C. Potato soil-borne diseases. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 2012;32:93-132.
120. Flannery ML, Meade C, Mullins E. Employing a composite gene-flow index to numerically quantify a crop's potential for gene flow: an Irish perspective. *Environ. Biosafety Res.* 2005;4:29–43.
121. Foster SJ, Park T-H, Pel M, Brigneti G, Sliwka J, Jagger L, van der Vossen E, Jones JDG. *Rpi-vnt1.1*, a *Tm-2(2)* homolog from *Solanum venturii*, confers resistance to potato late blight. *Mol Plant Microbe Interact.* 2009;22(5):589-600.
122. Franco I, Castillo E, Pérez MD, Calvo M, Sánchez L. Effects of hydrostatic high pressure on the structure and antibacterial activity of recombinant human lactoferrin from transgenic rice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2012;76(1):53-59.
123. Frary A, Earle E. An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. *Plant Cell Rep.* 1996;16:235-240.
124. Freese B, Hansen M, Gurian-Sherman D. Pharmaceutical rice in California. [Internet] 2004. Available from: https://advocacy.consumerreports.org/press_release/cu-comments-to-usda-about-ventrias-drug-producing-rice/
125. Freese B. A grain of caution: a critical assessment of pharmaceutical rice. Center for Food Safety. [Internet] 2007. Available from: <https://www.centerforfoodsafety.org>.
126. Fry W. *Phytophthora infestans*: the plant (and *R*-gene) destroyer. *Mol. Plant Pathol.* 2008;9(3):385-402.

127. Fukuta S, Kawamoto K, Mizukami Y, Yoshimura Y, Ueda J, Kanbe M. Transgenic tobacco plants expressing antimicrobial peptide bovine lactoferricin show enhanced resistance to phytopathogens. *Plant Biotechnol.* 2012;29(4):383-389.
128. Funakoshi T, Hosaka T, Inoue E, Anzai H. Gene expression of lactoferrin-derived antimicrobial peptides in rice. *Plant Physiol. Biochem.* 2017;123.
129. Gelvin S, Liu C. Genetic manipulation of *Agrobacterium tumefaciens* strains to improve transformation of recalcitrant plant species. *Plant Mol. Biol. Manual.* Springer: Dordrecht, 1994. p. 85-97.
130. Gerszberg A, Hnatuszko-Konka K, Kowalczyk T, Kononowicz AK. Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2015;120:881–902.
131. Gerszberg A, Hnatuszko-Konka K. Tomato tolerance to abiotic stress: a review of most often engineered target sequences. *Plant Growth Regul.* 2017;83:175–198.
132. Gharelo RS, Oliaei ED, Bandehagh A, Khodadadi E, Noparvar PM. Production of therapeutic proteins through plant tissue and cell culture. *J. BioSci. Biotech.* 2016;5:93-104.
133. Giansanti F, Panella G, Leboffe L, Antonini G. Lactoferrin from milk: nutraceutical and pharmacological properties. *Pharmaceuticals.* 2016; 9.
134. Gillund F, Hilbeck A, Wikmark O-G. Genetically modified potato with increased resistance to *P. infestans* - selecting test species for environmental impact assessment on non-target organisms. *GenØk Biosafety Report.* [Internet] 2011. Available from: <https://genok.no/wp-content/uploads/2013/04/Biosafety-Report-2013.01.pdf>
135. Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2005;43:205-227.
136. Grant MR, Kazan K, Manners JM. Exploiting pathogens' tricks of the trade for engineering of plant disease resistance: challenges and opportunities. *Microb. Biotechnol.* 2013;6:212-222.

137. Green J, Wang D, Lilley CJ, Urwin PE, Atkinson HJ. Transgenic potatoes for potato cyst nematode control can replace pesticide use without impact on soil quality. *PLoS ONE*. 2012;7(2): e30973.
138. Greiner R. Genetic engineering and functional foods. *J. Brazilian Soc. Food Nutr.* 2007;32:123-141.
139. Guarischi-Sousa R, Puigvert M, Coll NS, Siri MI, Pianzola MJ, Valls M, Setubal JC. Complete genome sequence of the potato pathogen *Ralstonia solanacearum* UY031. *Stand Genomic Sci.* 2016;11:7.
140. Hakansson A, Zhivotovsky B, Orrenius S, Sabharwal H, Svanborg C. Apoptosis induced by a human milk protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. Unit. St. Am.* 1995;92:8064–8068.
141. Halterman D, Guenthner J, Collinge S, Butler N, Douches D. biotech potatoes in the 21st century: 20 years since the first biotech potato. *Amer. Jour. Potato Res.* 2016;93:1–20.
142. Hameed A, Zaidi SS, Shakir S, Mansoor S. Applications of new breeding technologies for potato improvement. *Front. Plant Sci.* 2018;9:925.
143. Han EH, Goo YM, Lee MK, Lee SW. An efficient transformation method for a potato (*Solanum tuberosum* L. var. Atlantic). *J. Plant Biotechnol.* 2015;42:77-82.
144. Han J, Lakshman DK, Galvez LC, Mitra S, Baenziger PS, Mitra A. Transgenic expression of lactoferrin impacts enhanced resistance to head blight of wheat caused by *Fusarium graminearum*. *BMC Plant Biol.* 2012;12(1).
145. Harris PM. The potato crop. The scientific basis for improvement. 2nd ed. Netherlands: Springer; 1992. 909 p.
146. Heinemann JA, Morris CT, Goven J, Hunt LM. Assessing plant biopharming in New Zealand: Knowledge from the arable sector. Research report №15: 2009, 31 p.
147. Huang N, Bethell D, Card C, Cornish J, Marchbank T, Wyatt D, Mabery K, Playford R. Bioactive recombinant human lactoferrin, derived from rice, stimulates mammalian cell growth. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2008;44:464-471.

148. Huang S, Vleeshouwers VGAA, Visser RGF, Evert J. An accurate *in vitro* assay for high-throughput disease testing of *Phytophthora infestans* in potato. *Plant Dis.* 2005;89:1263-1267.
149. Huet G. Breeding for resistances to *Ralstonia solanacearum*. *Front. Plant Sci.* 2014; 5:715.
150. Humphrey BD, Huang N, Klasing KC. Rice expressing lactoferrin and lysozyme has antibiotic-like properties when fed to chicks. *J. Pediatric Gastroenterol. Nutrition.* 2003;36(2):190-199.
151. Hussey G, Stacey NJ. *In vitro* propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Annals of Bot.* 1981;48(6):787-796.
152. Hutton SF, Scott JW, Jones JB, Stall RE, Vallad GE, Staskawicz BJ, Horvath DM. The Good, the Bad, and the Ugly: what the future could hold for *Bs2* tomatoes. EDIS report HS1259, 2015, Gainesville, FL: University Florida Institute of Food and Agricultural Sciences.
153. Salem J, Hassanein AM. *In vitro* propagation, microtuberization, and molecular characterization of three potato cultivars. *Biol. Plant.* 2017;61:427–437.
154. Jabeen N, Mirza B, Chaudhary Z, Rashid H, Gulfraz M. Study of the factors affecting *Agrobacterium*-mediated gene transformation in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Riogrande using rice chitinase (*cht-3*) gene. *Pak. J. Bot.* 2009;41(5):2605-2614.
155. JayaSree T, Pavan U, Ramesh M, Rao AV, Jagan Mohan Reddy K, Sadanandam A. Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. *Plant Cell Tis. Org. Cult.* 2001;64:13–17.
156. Jeroen S, Damm B, Melchers L, Hoekema A. Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Rep.* 1993;12:644-647.
157. Jo SH, Kwon SY, Park DS, Yang KS, Kim JW, Lee KT, Kwak SS, Lee HS. High-yield production of functional human lactoferrin in transgenic cell cultures of siberian ginseng (*Acanthopanax senticosus*). *Biotechnol. Bioprocess Engineer.* 2006;11(5):442-448.

158. Johansen IE, Liu Y, Jørgensen B, Bennett EP, Andreasson E, Nielsen KL, Blennow A, Petersen BL. High efficacy full allelic CRISPR/Cas9 gene editing in tetraploid potato. *Scientific Reports*. 2019;9:17715.
159. Jones H, Ooms GJ, Michael GK. Transient gene expression in electroporated *Solanum* protoplasts *Plant Molec. Biol.* 1989;13:503-511.
160. Jones JDG, Witek K, Verweij W, Jupe F, Cooke D, Dorling S, Tomlinson L, Smoker M, Perkins S, Fosterl S. Elevating crop disease resistance with cloned genes. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2014;369.
161. Jung Y, Kang K. Application of antimicrobial peptides for disease control in plants. *Plant. Breed. Biotech.* 2014;2:1-13.
162. Kameranova K, Gecheff K, Stoyanova M, Muhovski Y, Anzai H, Atanassov A. Production of recombinant human lactoferin in transgenic barley. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 2007;21:18-27.
163. Kaur A, Sudhakara RM, Kumar A. Efficient, one step and cultivar independent shoot organogenesis of potato. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2017;23(2):461–469.
164. Kawchuk LM, Hachey J, Lynch DR, Kulcsar F, van RG, Waterer DR, Robertson A, Kokko E, Byers R, Howard RJ, Fischer R, Prüfer D. Tomato *Ve* disease resistance genes encode cell surface-like receptors. *PNAS.* 2001;98(11):6511-6515.
165. Khalatur S. Important provisions for the development of agriculture of Ukraine. *Balt. J. Econom. St.* 2017;3(2):147-154.
166. Khaliluev MR, Shpakovskii GV. Genetic engineering strategies for enhancing tomato resistance to fungal and bacterial pathogens. *Russ. Jour. Plant Physiol.* 2013;60:721–732.
167. Khan MS, Usman M, Lilla MI. Facile plant regeneration from tomato leaves induced with spectinomycin. *Pak. J. Bot.* 2006;38(4):947-952.
168. Khatun A, Hasan MM, Bachchu MAA, Moniruzzaman M, Nasiruddin KM. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of potato (*Solanum tuberosum* L.) var. Cardinal and Heera. *The Agriculturists.* 2012;10(1):81-86.

169. Kim J-S, Ezura K, Lee J, Ariizumi T, Ezura H. Genetic engineering of parthenocarpic tomato plants using transient *SIIAA9* knockdown by novel tissue-specific promoters. *Sci. Rep.* 2019;9:18871
170. Kolomic JV, Avetisyan JF. Bacterial diseases of tomatoes in the farm Dnipropetrovsk region. *Науковий журнал “біологічні системи: теорія та інновації”*. 2014;204.
171. Kolomiets YV, Grygoryuk IP, Butsenko LM, Kalinichenko AV. Biotechnological control methods against phytopathogenic bacteria in tomatoes. *Appl. Ecol. Env. Res.* 2019;17:3215-3230.
172. Kolomiets YV, Grygoryuk IP, Butsenko LM. Bacterial diseases of tomato plants in terms of open and covered growing of Ukraine. *Ann. Agri. Sci.* 2017;15:213-216.
173. Kolomiets YV, Grygoryuk IP, Likhanov AF, Butsenko LM, Blume YB. Induction of bacterial canker resistance in tomato plants using plant growth promoting *Rhizobacteria*. *Open Agric. J.* 2019;13:215-222.
174. Kolomiets YV. Investigation of the influence of salicylic acid on the causes of bacterial diagnostics of tomatoes. *Scientific Journal “ScienceRise:Biological Science”*. 2017;2(5):14-18.
175. Koo J, Park D, Kim H. Expression of bovine lactoferrin N-lobe by the green alga, *Chlorella vulgaris*. *Algae.* 2013;28:379-387.
176. Kovaliv Y. Agricultural sector of Ukraine: securing the global food supply. (Internet). National Investment Council of Ukraine; 2018 (updated 2018 July 7; cited 2020 July 21). Available from: <https://www.agroberichtenbuitenland.nl/binaries/agroberichtenbuitenland/documenten/rapporten/2018/07/04/ua-report-investment-council-ua-agriculture/agro-small.pdf>.
177. Kramer MG, Redenbaugh K. Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene: The FLAVR SAVR™ tomato story. *Euphytica.* 1994;79:293–297.
178. Krishna R, Karkute SG, Waquar AA, Durgesh KJ, Verma JP, Singh M. Transgenic tomatoes for abiotic stress tolerance: status and way ahead. *Biotech.* 2019;9:143.

179. Kumar V, Gill T, Grover S, Ahuja PS, Yadav SK. Influence of human lactoferrin expression on iron homeostasis, flavonoids, and antioxidants in transgenic tobacco. *Mol. Biotechnol.* 2012;53:118-128.
180. Kwon SY, Jo SH, Lee OS, Choi SM, Kwak SS, Lee HS. Transgenic ginseng cell lines that produce high levels of a human lactoferrin. *Planta Medica.* 2003;69:1005-1008.
181. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-685.
182. Lahoz E, Pisacane A, Iannaccone M, Palumbo D, Capparelli R. Fungistatic activity of iron-free bovin lactoferrin against several fungal plant pathogens and antagonists. *Nat. Prod. Res.* 2008;22:955-961.
183. Lakshman DK, Natarajan S, Mandal S, Mitra A. Lactoferrin derived resistance against plant pathogens in transgenic plants. *J. Agric. Food Chem.* 2013;61:11730-11735.
184. Lazebnik J, Arpaia S, Baldacchino F, Banzato P, Moliterni S, Vossen JH, van de Zande EM, van Loon JJA. Effects of a genetically modified potato on a non-target aphid are outweighed by cultivar differences *J. Pest. Sci.* 2017;90:855–864.
185. Lee J, Ki I, Kim H, Shin K, Suh S, Kweon S, Rhim S. Development of transgenic rice lines expressing the human lactoferrin gene. *Jour. Plant Biotechnol.* 2010a;37:556-561.
186. Lee TJ, Coyne DP, Clemente TE, Mitra A. Partial resistance to bacterial wilt in transgenic tomato plants expressing antibacterial lactoferrin gene. *J. American Soc. Horticult. Sci.* 2002;127(2):158-164.
187. Lee TT, Chang CC, Juang RS, Chen RB, Yang HY, Chu LW, Wang SR, Tseng TH, Wang CS, Chen LJ, Yu B. Porcine lactoferrin expression in transgenic rice and its effects as a feed additive on early weaned piglets. *J. Agriculture Food Chem.* 2010b;58(5,8):166-173.
188. Legrand D, Salmon V, Spik G, Gruber V, Bournat P, Merot B. Recombinant lactoferrin, methods of production from plants and uses. US Patent No. 6,569,831 B1, May 27, 2003

189. Li Y, Geng Y, Song H, Zheng G, Huan L, Qiu B. Expression of a human lactoferrin N-lobe in *Nicotiana benthamiana* with Potato virus X-based agroinfection. *Biotechnol Lett.* 2004;26:953-947.
190. Liedl BE, Labate JA, Stommel JR, Slade A, Kole C (editors). *Genetics, genomics, and breeding of tomato*. 1st ed. New York: CRC Press; 2013. 520 p.
191. Lina B, Qiaob M, Zheng R, Deng C, Mei S, Chen W. Phylogenomic analysis of transferrin family from animals and plants. *Comparative Biochem. Physiol. Part D.* 2016;17:1-8.
192. Liu Q, Guo Qigao, Akbar S, Zhi Y, Tahchy AE, Mitchell M, Li Z, Shrestha P, Vanhercke T, Ral J-P, Liang G, Wang M-B, White R, Larkin P, Singh S, Petrie J. Genetic enhancement of oil content in potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) through an integrated metabolic engineering strategy. *Plant Biotechnol. J.* 2017;15:56–67.
193. López-García B, San Segundo B, Coca M. Chapter 13. Antimicrobial peptides as a promising alternative for plant disease protection. In: *Small Wonders: Peptides for Disease Control*. ACS Symposium series, 2012. p. 263–294.
194. Lutfun N., Nasar A., Zinnah K., Ashrafuzzaman M. *In vitro* growth media effect for regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum*) and evaluation of the salt tolerance activity of callus. *J. of Agricult. and Sust.* 2013;3(2):132-143.
195. Ma J, Liu T, Qiu D. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation conditions for tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Omics J.* 2015;8:529-536.
196. Malakhova NP, Skiba YA, Tezekbayeva BK, Maltseva ER, Ismagulova GA. Optimization of core phases of biolistic transformation of potato. *BIO Web of Conferences* 2020;23:01007.
197. Malnoy M, Venisse JS, Brisset MN, Chevreau E. Expression of bovine lactoferrin cDNA confers resistance to *Erwinia amylovora* in transgenic pear. *Mol. Breed.* 2003;12(3):231-244.
198. Marcos JF, Muñoz A, Pérez-Payá E, Misra S, López-García B. Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for plant protection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2008;46:273-301.

199. Martínez MIS, Bracuto V, Koseoglou E, Appiano Mi, Jacobsen E, Visser RGF, Wolters A-MA, Bai Y. CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the tomato susceptibility gene *PMR4* for resistance against powdery mildew. *BMC Plant Biol.* 2020;20:284.
200. Martín-Pizarro C, Pose D. Genome editing as a tool for fruit ripening manipulation. *Front. Plant Sci.* 2018;9:1415.
201. Mazo-Molina C, Mainiero S, Haefner BJ, Bednarek R, Zhang J, Feder A, Shi K, Strickler SR, Martin GB. *Ptr1* evolved convergently with *RPS2* and *Mr5* to mediate recognition of *AvrRpt2* in diverse *Solanaceous* species. *Plant Jour.* 2020;103(4):1433-1445.
202. McDonald BA, Stukenbrock EH. Rapid emergence of pathogens in agroecosystems: global threats to agricultural sustainability and food security. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2016 Dec 5;371(1709):20160026.
203. Michalska AM, Sobkowiak S, Flis B, Zimnoch-Guzowska E. Virulence and aggressiveness of *Phytophthora infestans* isolates collected in Poland from potato and tomato plants identified no strong specificity. *Eur. J. Plant Pathol.* 2016;144:325–336.
204. Min SR, Woo JW, Jeong WJ, Han SK, Lee YB, Liu JR . Production of human lactoferrin in transgenic cell suspension cultures of sweet potato. *Biol. Plant.* 2006;50:131-134.
205. Mitra A, Zhang Z. Expression of a human lactoferrin cDNA in tobacco cells produces antibacterial protein(s). *Plant Physiol.* 1994;106:977-981.
206. Molla MMH, Nasiruddin KM, Al-Amin M, Haque MS. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation in potato. *Thai Jour. Agricult. Sci.* 2011;44(2):93-102.
207. Moosa A, Farzand A, Sahi ST, Khan SA. Transgenic expression of antifungal pathogenesis-related proteins against phytopathogenic fungi – 15 years of success. *Israel J. Plant Sci.* 2017;65:38-54.
208. Morcillo RJL, Zhao A, Tamayo-Navarrete MI, García-Garrido JM, Macho AP. Tomato root transformation followed by inoculation with *Ralstonia solanacearum* for straightforward genetic analysis of bacterial wilt disease. *J. Vis. Exp.* 2020;157:e60302.

209. Mullins E, Milbourne D, Petti C, Doyle-Prestwich BM, Meade C. Potato in the age of biotechnology. *TRENDS in Plant Sci.* 2006;11(5):254-259.
210. Muñoz A, Marcos JF. Activity and mode of action against fungal phytopathogens of bovine lactoferricin-derived peptides. *J. Appl. Microbiol.* 2006;101:1199-1207.
211. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962;15:473-497.
212. Nandi S, Suzuki AY, Huang J, Yalda D, Pham P, Wu L, Bartley G, Huang N, Lönnnerdal B. Expression of human lactoferrin in transgenic rice grains for the application in infant formula. *Plant Sci.* 2002;163:713-722.
213. Nandi S, Yalda D, Lu S, Nikolov Z, Misaki R, Fujiyama K, Huang N. Process development and economic evaluation of recombinant human lactoferrin expressed in rice grain. *Transgenic Res.* 2005;14:237-249.
214. Nguyen TC, Lakshman DK, Han J, Galvez LC, Mitra A. Transgenic plants expressing antimicrobial lactoferrin protein are resistant to a fungal pathogen. *J. Plant Mol. Biol. Biotechnol.* 2011;2(1):1-8.
215. Nowicki M, Foolad MR, Nowakowska M, Kozik EU. Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: an overview of pathology and resistance breeding. *Plant Dis.* 2011;96:4-17.
216. Nuñez AMP, Rodríguez GAA, Monteiro FP, Faria AF, Silva JCP, Monteiro ACA, Carvalho CV, Gomes LAA, Souza RM, Souza JT, Medeiros FHV. Bio-based products control black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) and increase the nutraceutical and antioxidant components in kale. *Sci. Rep.* 2018;8.
217. Occhialini A, Pfothenauer AC, Frazier TP, Li L, Harbison SA, Lail AJ, Mebane Z, Piatek AA, Rigoulot SB, Daniell H, Stewart CN, Lenaghan SC. Generation, analysis, and transformation of macro-chloroplast potato (*Solanum tuberosum*) lines for chloroplast biotechnology. *Nature.* 2020;10:21144.
218. Okungbowa FI, Shittu HO. *Fusarium* wilts: an overview. *Environment. Res. Jour.* 2012;6(2):83-102.
219. Onuoha, S.C. and Alisa, C.O. () Antimicrobial Potential of Leaf Juice and Extracts of *Moringa oleifera* Lam against Some Human Pathogenic Bacteria. *IOSR J. Pharm. Biol. Sci.* 2013;5:37-42.

220. Opabode J. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. *Biotechnol. Mol. Biol. Reviews.* 2006;1(1):12-20.
221. Osusky M, Zhou G, Osuska L, Hancock RE, Kay WW, Misra S. Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. *Nat. Biotechnol.* 2000;18:1162-1166.
222. Owen W, Punja ZK. Genetic engineering for increasing fungal and bacterial disease resistance in crop plants. *GM Crops.* 2010;1:199-206.
223. Paduchuri P, Gohokar S, Thamke B, Subhas M. Transgenic tomatoes – a review. *Internat. Jour. Adv. Biotechnol. Res.* 2010;1(2):69-72.
224. Pane C, Celano G, Vilecco D, Zaccardelli M. Control of *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternate* and *Pyrenochaeta lycopersici* on tomato with whey compost-tea applications. *Crop Protect.* 2012;38:80-86.
225. Pang X, Tong Y, Xue W, Yang YF, Chen X, Liu J, Chen D. Expression and characterization of recombinant human lactoferrin in edible alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2019;83:851-859.
226. Park SH, Morris JL, Eun PJ, Hirschi KD, Smith RH. Efficient and genotype-independent *Agrobacterium*-mediated tomato transformation. *J. Plant Physiol.* 2003;160:1253-1257.
227. Patil VU, Gopa J, Singh BP. Improvement for bacterial wilt resistance in potato by conventional and biotechnological approaches. *Agric. Res.* 2012;1:299-316.
228. Patil VU, Singh R, Vanishree G, Dutt S, Kavar PG, Bhardwaj V, Singh BP. Genetic engineering for enhanced nutritional quality in potato - a review. *Potato J.* 2016; 43(1):1-21.
229. Plana D, Alvarez M, Lara RM, Florido M, Alvarez F, Moya C. A new *in vitro* regeneration protocol in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Cult. Trop.* 2005;26(2):17-20.
230. PM 7/42 (3) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *EPPO Bull.* 2016;46: 202-225.
231. Podhaietskyi AA, Kravchenko NV, Kovalenko VM, Bondus RO, Hordienko VV, Cherednichenko LM, Sobra VM. Ecological testing of potatoes. *Ukr. J. Ecol.* 2018;8(4)17-25.

232. Rachmawati D, Mori T, Hosaka T, Takaiwa F, Inoue E, Anzai H. Production and characterization of recombinant human lactoferrin in transgenic Javanica rice. *Breed. Sci.* 2005;55:213-222.
233. Rachmawati D, Daryono B, Nuringtyas T, Anzai H. Genetic and molecular analysis of transgenic rice cv. Rojolele expressing lactoferrin. *Jour. Agric. Sci.* 2014;6:1-11.
234. Rogers SO, Bendich AJ. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 1985;5:69-76.
235. Rommens CM, Kishore GM. Exploiting the full potential of disease-resistance genes for agricultural use. *Curr. Opinion Biotechnol.* 2000;11:120-125.
236. Rudelsheim PLJ, Smets G. Baseline information on agricultural practices in the EU potato (*Solanum tuberosum* L.). Belgium:Perseus; 2012. 90 p.
237. Runno-Paurson E, Ronis A, Hansen M, Aav A, Williams IH. Lithuanian populations of *Phytophthora infestans* revealed a high phenotypic diversity. *J.Plant Dis.Protect.* 2015;2:57-65.
238. Saker MM, Salama HS, Salama M, El-Banna A, Ghany ANM. Production of transgenic tomato plants expressing *Cry2Ab* gene for the control of some lepidopterous insects endemic in Egypt. *J. Genet. Eng. Biotech.* 2011;9:149-155.
239. Salmon V, Legrand D, Slomianny MC, el Yazidi I, Spik G, Gruber V, Bournat P, Olganier B, Mison D, Theisen M, Mérot B. Production of human lactoferrin in transgenic tobacco plants. *Protein Expr. Purif.* 1998;13:127-135.
240. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4th ed. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2012. 1881 p.
241. Samyn-Petit B, Gruber V, Flahaut C, Wajda-Dubos J-P, Farrer S, Pons A, Desmaizieres G, Slomianny M-C, Theisen M, Delannoy P. N-glycosylation potential of maize: the human lactoferrin used as a model. *Glycoconjugate J.* 2001;18:519-527.
242. Samyn-Petit B, Wajda-Dubos JP, Chirat F, Coddeville B, Demaizieres G, Farrer S, Slomianny MC, Theisen M, Delannoy P. Comparative analysis of the site-specific N-glycosylation of human lactoferrin produced in maize and tobacco plants. *Eur. J. Biochem.* 2003;270:3235-3242.

243. Sen Y, Feng Z, Vandenbroucke H, van der WJ, Visser RGF, van Heusden AW. Screening for new sources of resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) in tomato. *Euphytica*. 2013;190:309-317.
244. Shah S, Ali S, Jan S, Din J, Ali G. Callus induction, in vitro shoot regeneration and hairy root formation by the assessment of various plant growth regulators in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.). *J. Anim. Plant Sci*. 2015;25(2):528-538.
245. Sharma M, Solanke A, Jani D, Singh Y, Sharma A. A simple and efficient *Agrobacterium*-mediated procedure for transformation of tomato. *J. Biosci*. 2009;34:1-11.
246. Sheng S., Xiu-Ping K., Xiao-Juan X., Xiao-Yong X., Jiao Ch., Shao-Wen Zh. Guo-Ming X. *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Hezuo 908) with improved efficiency. *Biotech. Biotechnol. Equip*. 2015;29(5):861-868.
247. Sherkar H, Chavan A. Studies on callus induction and shoot regeneration in tomato. *Sci. Res. Rep*. 2014;4(1):89-93.
248. Shin DY, Seong ES, Na JK, Yoo JH, Kang WH, Ghimire BK, Lim JD, Yu CY. Conditions for regeneration and transformation of *Solanum tuberosum* cultivars using the cotton glutathione S-transferase (*Gh-5*) gene, *African J. Biotechnol*. 2011;10(67):15135–15141.
249. Sinha M, Kaushik S, Kaur P, Sharma S, Singh TP. Antimicrobial lactoferrin peptides: the hidden players in the protective function of a multifunctional protein. *Int. J. Pept*. 2013;12:390-230.
250. Sohail A, Sabir S, Shaukat A, Ghulam M. The effect of plant growth regulators on callus induction and somatic embryogenesis of hybrid tomato. *Pak. J. Bot*. 2015;47(5):1671-1677.
251. Sohrabi SM, Niazi A, Chahardooli M, Aram F. Isolation and expression of antimicrobial camel lactoferrin (*cLf*) gene in tobacco. *Plant OMICS*. 2014;7:298-307.
252. Soto N, Enríquez GA, Ferreira A, Corrada M, Fuentes A, Tiel K, Pujol M. Efficient transformation of potato stems segments from cultivar Désirée, using phosphinothricin as selection marker. *Biotechnol. Apl*. 2007;24(2):139-144.

253. Spik G, Strecker G, Fournet B, Bouquelet S, Montreuil J. Primary structure of the glycans from human lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.* 1982;121:413-419.
254. Spik G, Theisen M. Characterization of the post-translational biochemical processing of human lactoferrin expressed in transgenic tobacco. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz.* 2000;43:104-109.
255. Stefańczyk E, Sobkowiak S, Brylińska M, Śliwka J. Diversity of *Fusarium* spp. associated with dry rot of potato tubers in Poland. *Europ. Jour. Plant Pathol.* 2016;145:871-884.
256. Stefanova G, Slavov S, Gecheff K, Vlahova M, Atanassov A. Expression of recombinant human lactoferrin in transgenic alfalfa plants. *Biol. Plant.* 2013a;57(3):457-464.
257. Stefanova G, Vlahova M, Atanassov A. Production of recombinant human lactoferrin from transgenic plants. *Biol. Plant.* 2008;52:423-428.
258. Stefanova G, Vassileva V, Vlahova M. Human lactoferrin changes leaf morphology and pathogen resistance of *Medicago sativa* L. *Bulgarian J. Agric. Sci.* 2013b;19:706–713.
259. Strange RN, Scott PR. Plant disease: a threat to global food security. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2005;43:83-116.
260. Suzuki YA, Kelleher SL, Yalda D, Wu L, Huang J, Huang N, Lönnnerdal B. Expression, characterization, and biologic activity of recombinant human lactoferrin in rice. *Jour. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2003;36:190-199.
261. Taha SH, Mokbel SA, Abdel-Hamid M, Hamed AH. Antiviral activity of lactoferrin against Potato virus X *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Dairy Sci.* 2015;10:86-94.
262. Takase K, Hagiwara K, Onodera H, Nishizawa Y, Ugaki M, Omura T, Numata S, Akutsu K, Kumura H, Shimazaki K. Constitutive expression of human lactoferrin and its N-lobe in rice plants to confer disease resistance. *Biochem. Cell Biol.* 2005;83(2):239-249.

263. Tanasienko IV, Yemets AI, Pirko YV, Korhkovyy VI, Abumhadi N, Blume YB. Generation of transgenic barley lines producing human lactoferrin using mutant alpha-tubulin gene as the selective marker. *Cyt. Genet.* 2011;45:3-10.
264. Tomlinson L, Yang Y, Emenecker R, Smoker M, Taylor J, Perkins S, Smith J, MacLean D, Olszewski NE, Jones JDG. Using CRISPR/Cas9 genome editing in tomato to create a gibberellin-responsive dominant dwarf DELLA allele. *Plant Biotechnol. Jour.* 2019;17:132–140
265. Tournas V, Stack ME, Mislivec PB, Koch HA, Bandler R. Chapter 18. Yeasts, Molds, and Mycotoxins. In: *FDA Bacteriological Analytical Manual*. 8th edn. Revision A. USA: AOAC International, 1998.
266. Trail F. For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant Physiol.* 2009;149(1):103-110.
267. Tsygankova V, Andrusevich Y, Shtompel O, Kopich V, Solomyanny R, Bondarenko O, Brovarets V. Phytohormone-like effect of pyrimidine derivatives on regulation of vegetative growth of tomato. *Internat. Jour. Bot. Stud.* 2018;3(2):91-102.
268. Tsygankova V, Shysha E, Galkin A, Biliavska L, Iutynska G, Yemets A, Blume Y. Impact of microbial biostimulants on induction of callusogenesis and organogenesis in the isolated tissue culture of wheat *in vitro*. *J. Med. Plants Studies.* 2017;5(3):155-164
269. Tsygankova VA, Andrusevich YV, Shtompel OI, Kopich VM, Solomyanny RM, Brovarets V. Study of regulating activity of synthetic low molecular weight heterocyclic compounds, derivatives of pyrimidine on growth of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seedlings. *V.S. Internat. Jour. ChemTech Res.* 2019;12(5):26-38
270. Vallarino JG, Kubiszewski-Jakubiak S, Ruf S, Rößner M, Timm S, Bauwe H, Carrari F, Rentsch D, Bock R, Sweetlove LJ, Fernie AR. Multi-gene metabolic engineering of tomato plants results in increased fruit yield up to 23%. *Sci. Rep.* 2020;10:17219.
271. van Leeuwen M, Salamon P, Fellmann T, Banse M, von Ledebur O, Salputra G, Nekhay O. The agri-food sector in Ukraine: current situation and market outlook until 2025. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2012. 74 p.

272. Vinterhalter D, Zdravkovi-Kora S, Miti N, Dragievi I, Cingel A, Raspor M, Ninkovi S. Protocols for Agrobacterium-mediated transformation of potato. *Fruit Veg. Cereal Sci. Biotechnol.* 2008;2:1-15
273. Viuda-Martos M, Sanchez-Zapata E, Sayas-Barberá E, Sendra E, Pérez-Álvarez JA, Fernández-López J. Tomato and tomato byproducts. Human health benefits of lycopene and its application to meat products: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2014;54(8):1032-1049.
274. Vlahova M, Stefanova G, Petkov P, Barbulova A, Petkova D, Kalushkov P, Atanassov A. Genetic modification of alfalfa (*Medicago sativa* L.) for quality improvement and production of novel compounds. *Biotechnol. Biotechn. Equipm.*, 2005;19(3):56-62.
275. Vleesschouwers VGAA, van Dooijeweert W, Keizer LCP, Sijpkens L, Govers F, Colon LT. A laboratory assay for *Phytophthora infestans* resistance in various *Solanum* species reflects the field situation. *European Jour Plant Pathol.* 1999;105:241-250.
276. Vlokh VG. History of selection of potato in the Western region of Ukraine. *Ukr. J. Phys. Opt.* 2010;11(4):35-45.
277. Wakabayashi H, Oda H, Yamauchi K, Abe F. Lactoferrin for prevention of common viral infections. *Infect. Chemother.* 2014;20:666–671.
278. Wang X, Hao Y, Teng D, Wang J. Research and development on lactoferrin and its derivatives in China from 2011-2015. *Biochem. Cell Biol.* 2017;95:162-170.
279. Wang Y, Zhang Y, Gao Z, Yang W. Breeding for resistance to tomato bacterial diseases in China: challenges and prospects. *Horticult. Plant Jour.* 2018;4(5):193-207.
280. Wang Y-H, Campbell MA. Agrobacterium-mediated transformation of tomato elicits unexpected flower phenotypes with similar gene expression profiles *PLoS One.* 2008;3(8):e2974.
281. Wittmann J, Brancato C, Berendzen KW, Dreiseikelmann B. Development of a tomato plant resistant to *Clavibacter michiganensis* using the endolysin gene of bacteriophage CMP1 as a transgene. *Plant Pathol.* 2016;65:496–502.

282. Xhulaj DB, Gixhari B. *In vitro* micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L). cultivars. *Agricult. Forest.* 2018;64(4)105-112.
283. Xin C, Li N, Guo J. Potato late blight control using R-gene polyculture by GMO. *Energy Procedia.* 2012;16:1925–1929.
284. Xu X, Huang X-F, Visser RGF, Trindade LM. Engineering potato starch with a higher phosphate content. *PLoS ONE* 2017;12(1):e0169610.
285. Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 1992;36(12):1251-1275.
286. Yemets AI, Tanasienko IV, Krasnylenko YA, Blume YB. Plant-based biopharming of recombinant human lactoferrin. *Cell Biol. Int.* 2014;38:989-1002.
287. Yi Q, Lyu G, Zhang Z. Studies on immunomodulatory and antioxidant activities *in vitro* of recombinant human lactoferrin from transgenic rice. *Jour. Zhejiang Agric. Sci.* 2018;30:1-6.
288. Yuliar YAN, Toyota K. Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes Environ.* 2015;30(1):1-11.
289. Zhang Z, Coyne DP, Vidaver AK, Mitra A. Expression of human lactoferrin cDNA confers resistance to *Ralstonia solanacearum* in transgenic tobacco plants. *Phytopathology.* 1998;88:730-734.
290. Zuluaga AP, Vega-Arreguín JC, Fei Z, et al. Analysis of the tomato leaf transcriptome during successive hemibiotrophic stages of a compatible interaction with the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Pathol.* 2016;17(1):42-54.
291. Zuluaga AP, Vega-Arreguín JC, Fei Z, Ponnala L, Lee SJ, Matas AJ, Patev S, Fry WE, Rose JKC. Transcriptional dynamics of *Phytophthora infestans* during sequential stages of hemibiotrophic infection of tomato. *Molec Plant Pathol.* 2016;17(1):29-41.

Додаток

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Статті

1. **Buziashvili AY**, Cherednichenko LM, Kropyvko SV, Blume YB, Yemets AI. Transgenic tomato lines expressing human lactoferrin show increased resistance to bacterial and fungal pathogens. *Biocatal. Agricult. Biotechnol.* 2020;25. (Q2). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101602>. (*Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, аналіз експериментальних даних, написання статті*).
2. **Buziashvili AY**, Cherednichenko LM, Kropyvko SV, Blume YB, Yemets AI. Obtaining transgenic potato plants expressing the human lactoferrin gene and analysis of their resistance to phytopathogens. *Cytol. Genet.* 2020;54(3):179–188. (Q4). <https://doi.org/10.3103/S0095452720030020>. (*Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, аналіз експериментальних даних, написання статті*).
3. **Бузіашвілі АЮ**, Ємець АІ. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація українських сортів картоплі та томату геном лактоферину людини. *Доповіді НАН України.* 2018;10:88-94. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.10.088>. (*Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, аналіз експериментальних даних, написання статті*).
4. **Бузіашвілі АЮ**, Чередниченко ЛМ, Кропивко СВ, Ємець АІ. Лінії томатів, які експресують ген лактоферину людини, характеризуються стійкістю до фітофторозу. *Доповіді НАН України.* 2020;5:95–102. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.05.095>. (*Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, аналіз експериментальних даних, написання статті*).

5. **Бузіашвілі АЮ**, Ємець АІ. Аналіз впливу різних комбінацій регуляторів росту на регенерацію пагонів цінних сортів *Lycopersicon esculentum* Mill. в умовах *in vitro*. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2016;19:88–91. (Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, аналіз експериментальних даних, написання статті).

Тези

6. **Buziashvili AY**, Yemets AI. *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato with human lactoferrin gene. Abstracts of the I International Conference for Young Scientists, September 21-25, Kyiv. 2015, p. 111.
7. **Buziashvili AY**, Yemets AI. Determination of the most favourable nutrient medium composition for *in vitro* cultivation and direct plantlet regeneration of tomato variety Perlyna. Abstracts of the XV International Conference of Students and Young Scientists “Shevchenkivska vesna: Bioscience Advances”, April 18-21 Kyiv. 2017, p. 9.
8. **Бузіашвілі АЮ**, Ємець АІ. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація томата сорту Лагідний для підвищення його стійкості проти фітопатогенів. Збірник тез доповідей III Міжнародної наукової конференції молодих учених “Біологія рослин та біотехнологія”, 16-18 травня Київ. 2017, с. 63
9. **Buziashvili AY**, Yemets AI. Establishment *in vitro* culture and plantlet regeneration of tomato cultivar Perlyna. Abstracts of the International Conference of Young Scientists “Modern problems of Microbiology and Biotechnology”, June 20-24 Odesa. 2017, p. 11-17.
10. **Buziashvili AY**, Yemets AI. Obtaining of phytopathogen-resistant tomato and potato plants with human lactoferrin gene. Abstracts of the 4th International Symposium on Euroasian Biodiversity. July 3-6 Kyiv. 2018, p. 12
11. **Бузіашвілі АЮ**, Ємець АІ. Антибактеріальна активність екстракту трансгенних рослин томату, що експресують ген лактоферину людини. Збірник тез доповідей V Міжнародної наукової конференції студентів,

- аспірантів та молодих вчених “Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології”, 7-8 листопада Вінниця. 2018, с. 73.
12. Yemets AI, **Buziashvili AY**. Lactoferrin expression as a tool for the enhancement of non-specific plant pathogen resistance. Abstracts of the VI Ukrainian Congress for Cell Biology with International Representation, June 18-21 Yaremche. 2019, p. 124.
 13. **Buziashvili AY**, Cherednichenko LM, Kropyvko SV, Yemets AI. Transgenic expression of human lactoferrin in potato plants enhance their resistance to fungal pathogens. Abstracts of the XVIII International Conference of Students and Young Scientists “Shevchenkivska vesna: Bioscience Advances”, May 2 Kyiv. 2020, p. 7-11
 14. **Buziashvili AY**, Cherednichenko LM, Kropyvko SV, Yemets AI. Expression of human lactoferrin in transgenic tomato lines enhance their resistance to bacterial and fungal phytopathogens. Abstracts of the XIV All-Ukrainian Conference of Young Scientists IMBG, 27-28 May Kyiv. 2020, p. 4.
 15. **Бузіашвілі АЮ**, Ємець АІ. Експресія лактоферину людини в трансгенних рослинах томатів та картоплі підвищує їх стійкість до фітопатогенів. Збірник тез доповідей V міжнародної наукової конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, 1-2 жовтня Дніпро. 2020, с. 63