

# Створення векторів трансформації рослин для отримання стійкості до потівірусів

І. В. Корнійчук, В. П. Поліщук, Ш. Д. Йе<sup>1</sup>

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна

<sup>1</sup>Національний університет Чонг Сін  
Вул. Куо-Куанг, 250, Тайчунг, Тайвань

taiwan06@mail.ru  
inna\_korniichuk@mail.ru

---

*Найконсервативнішими серед усіх ділянок геному потівірусів є гени HC-Pro, CP, NIb і CP. Порівняно нуклеотидну послідовність даних генів з-поміж 32 вірусів роду Potyvirus і відібрано ділянки, з найвищим відсотком ідентичності. Ділянки ампліфіковано з повнорозмірної κДНК вірусу мозаїки турнепсу (ВМТ) і вбудовано у висококопійний ТОРО-вектор, яким трансформовано компетентні клітини Escherichia coli. Створено вектори трансформації рослин на основі комерційної плазмиди pBI121, у якій вбудовано κДНК окремо однієї (HC-Pro, CP, NIb або CP), двох (HC-Pro та CP) і трьох (HC-Pro, CP і NIb) консервативних ділянок генів ВМТ. Отримано трансформовані клітини Agrobacterium tumefaciens, які несуть pBI121.*

*Ключові слова: потівіруси, резистентність, κДНК, ПЛР, трансформація рослин.*

---

**Вступ.** Потівіруси, а саме – представники роду *Potyvirus* викликають серйозні захворювання у рослин майже в усіх кліматичних зонах Землі, включаючи Європу, Африку, Азію, Океанію, Північну та Південну Америки [1]. На сьогодні існують фізичні, агротехнічні, біологічні та хімічні засоби боротьби з потівірусними інфекціями рослин. Проте, незважаючи на широке використання, ці підходи не виявили належної ефективності, оскільки не здатні забезпечити повної елімінації вірусу з організму рослини [2].

Після того як у 1985 році було розроблено концепцію патоген-індукованої резистентності (ПІР) [3], напрямок пошуку шляхів звільнення рослин від вірусів перемістився на створення трансгенних рослин, стійких до згаданих патогенів. На сьогодні вже існує велика кількість генетично модифікованих рослин, що несуть ділянки геному вірусів і проявляють високий рівень стійкості до останніх [4–6]. Один із шляхів отримання даного типу резистентності полягає у створенні трансгенних рослин на основі РНК-залежного мовчання генів, який за природних умов є одним із найголовніших захисних механізмів рослини [7–9]. Це посттранскрипційний процес, ініційований моле-

кулами дволанцюгової РНК, що призводить до деградації комплементарної РНК [10, 11].

Із застосуванням трансформації рослин за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* отримано низку рослин з високим рівнем стійкості до потівірусів [12, 13]. Однак до цього часу більшість експериментів було спрямовано на використання окремих вірусних генів для отримання стійкості [14–16], яка виявлялася досить тривалою, проте її недоліком була здатність інших штамів вірусів долати її, тобто резистентність мала вузький спектр дії. Зважаючи на це, важливим завданням на сьогодні є створення стійкості із широким спектром дії до багатьох штамів і видів вірусів [5, 17, 18].

Мета цієї роботи полягала у конструюванні векторів для трансформації, які несуть одну, дві або три консервативні ділянки геному потівірусу для порівняння рівня отриманої резистентності у рослин до представників роду *Potyvirus*.

**Матеріали і методи.** Відбір консервативних ділянок потівірусного геному. За допомогою комп'ютерних програм Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) та DNASTar. (<http://www.dnastar.com/>) проведено порівняння нуклеотидної послідовності генів *HC-Pro*, *CIP*, *Nib* і *CP* 32 вірусів роду *Potyvirus* та відібрано консервативні фрагменти на основі відсотка ідентичності та наявності важливих функціональних ділянок.

**Вірусна кДНК.** Як джерело ділянок ДНК для вбудовування у вектори для трансформації рослин використано повнорозмірну кДНК вірусу мозаїки турнепсу (ВМТ).

**Ампліфікація фрагментів.** Ампліфікацію консервативних ділянок генів *HC-Pro* (505 н.), *CIP* (620 н.), *Nib* (580 н.) і *CP* (455 н.) з кДНК ВМТ здійснювали методом ПЛР (денатурація – 1 цикл: 95 °C/5 хв; відпал – 30 циклів: 95 °C/30 с, 58 °C/30 с, 72 °C/30 с; елонгація – 1 цикл: 72 °C/5 хв). Для ампліфікації фрагмента *HC-Pro* використано праймер *pTuHC-XbaI* (5'-GCTCTAGATAATAACAGTCGAGTGTG-3'), що містив сайт рестрикції для *XbaI* і два ТАА стоп-кодони, та праймер *mTuHCSacIXhoI-KpnI* (5'-CGAGCTCCTCGAGGGTACCGTGAATTTGTGAGTTG-3') з сайтами рестрикції для *SacI*, *XhoI* і *KpnI*. Праймерами для ампліфікації консервативної ділянки гена *CIP* слугували *pTuCIPXbaIKpnI*

(5'-GCTCTAGAGGTACСТААТАААGACATATT-АСТААТGGG-3') з сайтами рестрикції для *XbaI* і *KpnI* та двома стоп-кодонами, а також *mTuCI-PXhoIPaCI* (5'-CCCTCGAGTTAATТААССААСТ-ТТСАТCGTTATT) з сайтами рестрикції для *XhoI* і *PaCI*. Для фрагмента *Nib* використано такі праймери: *pTuNibPaCI* (5'-ССТТААТТАА ТААТААС-СТАGGAААGATGGGAG-3') з сайтом рестрикції для *PaCI* і двома стоп-кодонами та праймер *mTuNibXhoISaII* (5'-CCCTCGAGGTCGACAATC-АТСТССТGTTGACG-3') з сайтами рестрикції для *XhoI* і *SaII*. Для ампліфікації ділянки гена *CP* застосовано праймер *pTuCPAvrIISaII* (5'-CCCCTAGGG-TCGACСТААТААААТGGTTТААТGGTCTGG-3'), що містив сайти рестрикції для *AvrII* та *SaII*, а також два стоп-кодони, та праймер *mTuCPXhoI* (5'-CCCTCGAGAACGCCСAGТААGTTATG-3') з сайтом рестрикції для *XhoI*.

**ТОРО-клонування та перевірка наявності фрагментів у ТОРО-векторі.** ТОРО-клонування ампліфікованих фрагментів кДНК проводили, використовуючи комерційний висококопійний PCR 2.1-ТОРО vector («Invitrogen», США) розміром 3,91 тис. н. відповідно до протоколу (<http://www.invitrogen.com>). Трансформовані вектором клітини *Escherichia coli* інкубували у LB середовищі (1 %-й триптон, 0,5 %-й екстракт дріжджів, 0,5 %-й NaCl) протягом 1 год за температури 37 °C. Після інкубування клітини *E. coli* висівали на селективне середовище LA (LB, 1,5 %-й агар) з IPTG (ізопропіл-бета-D-тіога-лактопіранозид) та X-gal (5-бромо-4-хлор-3-індол-D-галактопіранозид). З кожної чашки Петрі відбирали по вісім окремих колоній для перевірки наявності *HC-Pro*, вісім колоній – для *CP*, дві колонії – для *CIP* та п'ять колоній – для *Nib*. Відселектовані колонії інкубували в 1 мл LB протягом 8 год за температури 37 °C. Проводили центрифугування клітин *E. coli* у режимі 1 хв/1000 g, після чого супернатант видаляли, а до осаду додавали 300 мкл розчину TENS (TE-буфер, 0,1 N NaOH, 0,5 %-й SDS). Після легкого помішування до розчину вносили 150 мкл NaOAc та центрифугували при 2 хв/5000 g. До супернатанту додавали 900 мкл 100 %-го етанолу та центрифугували (2 хв/10000 g). 100 %-й C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH видаляли та додавали 900 мкл 80 %-го холодного етанолу. Після видалення

80 %-го спирту епендорфи добре просушували на повітрі. До епендорфів додавали 50 мкл дистильованої води та струшували для розчинення ДНК.

Виділену плазмідну ДНК використовували для проведення ПЛР. Послідовності фрагментів також перевіряли системою автоматичного секвенування ДНК («Applied Biosystems», США).

*Клонування в pBI121.* Фрагменти кДНК консервативних ділянок генів *HC-Pro*, *CIP*, *NiB* і *CP* вирізали з ТОРО-вектора за допомогою відповідних рестриктаз. Для створення конструкцій з однією консервативною ділянкою фрагменти *HC-Pro*, *CIP*, *NiB* і *CP* розрізали ферментами *XbaI* і *XhoI*. Для конструювання плазмід з двома ділянками *HC-Pro* та *CIP* було розрізано ферментами *XbaI/KpnI* і *KpnI/XhoI*. При отриманні конструкцій з трьома ділянками *HC-Pro*, *CIP* і *NiB* розщеплювали рестриктазами *XbaI/KpnI*, *KpnI/PacI* і *PacII/XhoI* відповідно. Ген *GUS* вирізали з комерційного вектора для трансформації рослин *pBI121* рестриктазами *XbaI* і *XhoI*.

Електрофорез продуктів рестрикції здійснювали в 1,2 %-му агарозному гелі. Фрагменти, які відповідали розмірам ділянок *HC-Pro*, *CIP*, *NiB* і *CP*, а також вектор *pBI121* вирізали з гелю та елюювали за допомогою Micro Elute DNA Clean/Extraction Kit («Genmark», Тайвань). Продукти елюції перевіряли на наявність фрагментів ДНК за допомогою електрофорезу в 0,8 %-му агарозному гелі.

Ділянки вбудовували у вектор *pBI121* за допомогою реакції лігування з Fast-Link DNA ligase («Ericentre», США). Для створення конструкцій з одним фрагментом кДНК консервативних ділянок окремо *HC-Pro*, *CIP*, *NiB* або *CP* було вбудовано в *pBI121*. Для отримання *pBI121* з двома ділянками *HC-Pro* та *CIP* вбудовували в *pBI121*, а для одержання трьох зв'язаних ділянок у векторі *HC-Pro*, *CIP* і *NiB* додавали разом до суміші лігування. У суміш вносили вектор та фрагменти у співвідношенні 1:3, 2 мкл 10 буфера для лігування, 1 мкл 25 мМ АТФ, 1 мкл ДНК-лігази, 12 мкл дистильованої  $H_2O$ . Суміш інкубували за температури 16 °C упродовж 8 год. Компетентні клітини *E. coli* трансформували 15 мкл продукту лігування методом хімічної трансформації [13, 19] та висівали на середовище LA з канаміцином (50 мг/л).

*Скринінг E. coli на наявність плазмід з ділянками кДНК потівірусних генів.* З кожної чашки Петрі відбирали по шість окремих колоній *E. coli*. Відселектовані колонії інкубували у 5 мл середовища LB за температури 37 °C протягом 8 год. Плазмідну ДНК виділяли за допомогою Plasmid miniprep purification Kit («Hopegen Biotechnology Enterprise», Тайвань). Ампліфікацію фрагментів *HC-Pro*, *CIP*, *NiB*, *CP*, *HC-CIP* і *HC-CIP-NiB* здійснювали за допомогою ПЛР. Рестрикційний аналіз проходив з використанням рестриктаз *XbaI* і *XhoI*. Продукти рестрикції вивчали електрофорезом у 0,8 %-му агарозному гелі.

*Трансформація A. tumefaciens плазмідною pBI121.* Клітини *A. tumefaciens* інкубували в 50 мкл середовища LB з додаванням 5 мкл стрептоміцину (50 мг/л) за температури 28 °C протягом 8 год до досягнення  $CD_{60} = 0,5$ . Клітини осаджували центрифугуванням при 5000 g (5 хв, 4 °C). Осад розчиняли в 10 мл 0,15 М NaCl та центрифугували при 5000 g (5 хв, 4 °C). Осад розчиняли в 1 мл холодного 20 мМ  $CaCl_2$ . Суспензію в об'ємі 0,2 мл переносили у нові епендорфи та додавали 1 мкл плазмідної ДНК, виділеної з *E. coli*. Епендорфи поміщали в ємність з рідким азотом на 1 хв, після чого інкубували за температури 28 °C упродовж 2–4 год. Клітини *A. tumefaciens* висівали на середовище LA з канаміцином (50 мг/л) та інкубували за температури 28 °C протягом 2–3 діб.

*Перевірка A. tumefaciens на наявність плазмід з однією, двома та трьома консервативними ділянками.* Плазмідну ДНК виділяли з окремих бактеріальних колоній *A. tumefaciens*. Ділянки *HC-Pro*, *CIP*, *NiB*, *CP*, *HC-CIP* і *HC-CIP-NiB* ампліфікували за допомогою ПЛР. Як контроль використано плазмідну ДНК, виділену з *E. coli*.

**Результати і обговорення.** З літературних даних відомо, що успішність процесу РНК-залежного мовчання генів, який лежить в основі отриманої стійкості у трансгенних рослин, визначається відсотком комплементарності між РНК вірусу та ДНК трансгена. Для ефективного процесу інактивації вірусної РНК кількість комплементарних основ має перевищувати 50 % [19, 20]. Тому необхідним завданням було знайти та обрати для створення векторів найконсервативніші ділянки геномів 32 потівірусів, щоб збільшити вірогід-

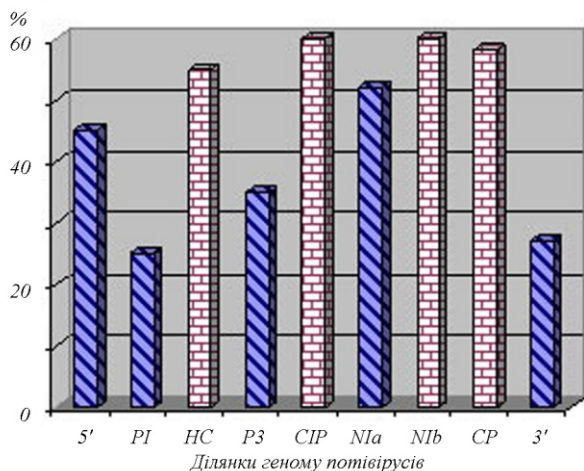


Рис. 1. Рівень гомології між нуклеотидними послідовностями ділянок геному 32 вірусів роду *Potyvirus*. 1 – літературні дані; 2 – результати, отримані нами

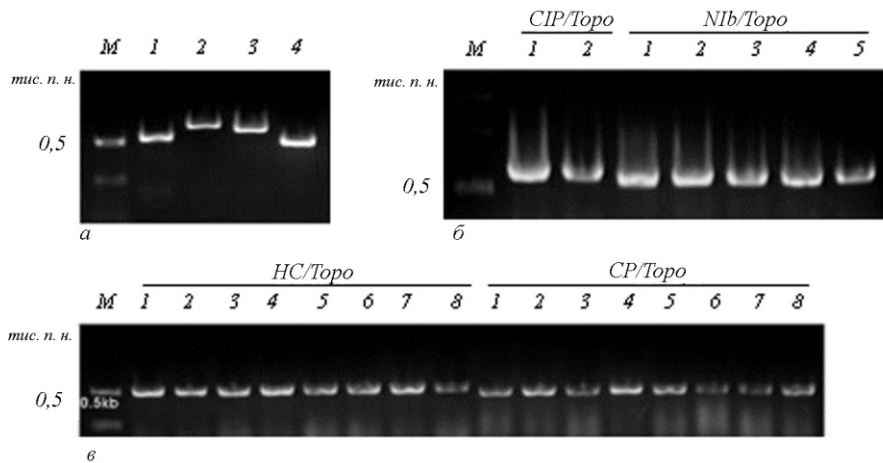


Рис. 2. Електрофореграми продуктів ампліфікації *HC-Pro* (1), *CIP* (2), *NIb* (3) і *CP* (4) з повнорозмірної кДНК вірусу мозаїки турнепсу (а) та продуктів ампліфікації *CIP*, *NIb* (б) і *HC-Pro*, *CP* (в) з *ТОРО*-вектора (номери доріжок відповідають зразкам з окремих колоній, пояснення в тексті)

ність комплементарного зв'язування з транскрипційною ДНК. Потівірусні гени *PI*, *P2*, *NIa*, 5'- та 3'-кінці мають рівень гомології, менший за 50 % [1]. Ми порівняли нуклеотидну послідовність генів *HC-Pro*, *CIP*, *NIb* і *CP* 32 вірусів роду *Potyvirus*. У результаті дані гени показали вищий рівень гомології, що проявлявся у більш ніж 50 % ідентичності (рис. 1). Вибір консервативних фрагментів у значній мірі залежав від наявності ділянок, що відповідають за важливі для вірусу функції. Так, в амінокислотній послідовності консервативної ділянки *HC-Pro* присутній мотив *CC/SC*, який відповідає за реплікацію та системний рух вірусу, а також ділянка РНК, необхідна для переносу попе-

лицями. Консервативна область в амінокислотній послідовності гена *CIP* містить нуклеотид-зв'язувальну ділянку *SxxSxxGKS*, характерну для багатьох геліказ [1]. У фрагменті *NIb* присутні три (I, II і III) з восьми ділянок, консервативних серед усіх РНК-полімераз вірусів з позитивним РНК-геномом [21]. Ділянка *CP* містить висококонсервативний фрагмент з п'яти кодонів, що, як показано для вірусу гравірування тютюну, відповідає за реплікацію потівірусів [11]. Зазначені фрагменти було ампліфіковано з повнорозмірної кДНК ВМТ за допомогою ПЛР, результати якої свідчать про наявність фрагментів, що відповідають розмірам консервативних ділянок (рис. 2, а).

Продукти ПЛР вбудовували в *ТОРО*-вектор та трансформували у компетентні клітини *E. coli*.

Останні висівали на середовище LA з індуктором транскрипції векторного гена галактозидази IPTG та продуктом для розщеплення даним ферментом X-gal. При вбудовуванні ПЛР-продукту в ділянку галактозидази (*lacZ*) у *Торо*-векторі ген, що кодує фермент, був розірваний і, отже, не транскрибувався і не трансліювався. Таким чином, клітини, що містили *Торо*-вектор, не здатні синтезувати галактозидазу і розщеплювати субстрат. Як наслідок, вони формували колонії білого кольору на відміну від блакитних, у яких X-gal взаємодіяв з ферментом. Для перевірки наявності вбудованих фрагментів з газону клітин *E. coli*, трансформованих *HC/Торо* та *CP/Торо*, відбирали по вісім білих



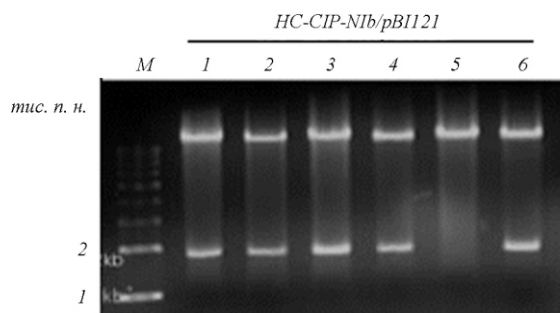


Рис. 3. Електрофорез продуктів рестрикції для визначення наявності *HC-CIP-Nib* у *pBI121* (номери доріжок відповідають зразкам з окремих колоній, пояснення в тексті)

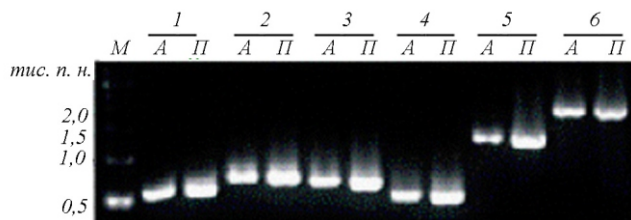


Рис. 4. Електрофореграма результатів ПЛР на присутність *HC-Pro* (1), *CIP* (2), *Nib* (3), *CP* (4), *HC-CIP* (5), *HC-CIP-Nib* (6) в *A. tumefaciens*. А, П – фрагменти, визначені в *A. tumefaciens* і в плазміді з *E. coli* відповідно

колоній; з газону клітин *E. coli*, трансформованих *CIP/Toro*, відселектовували дві колонії, а з газону клітин *E. coli*, що містили *Nib/Toro*, відбирали п'ять різних колоній та проводили ампліфікацію вбудованих ділянок методом ПЛР, за результатами якої фрагменти були присутніми у *Toro*-векторі та мали розмір, що відповідав розміру кожної консервативної ділянки (рис. 2, б).

Як вектор для трансформації рослин використовували вектор *pBI121* розміром 14 тис. н. з селективним маркером неоміцин-фосфотрансферази II (nptII), що обумовлював резистентність до канаміцину. Окрім nptII, *pBI121* містив ген глюкуронідази (*GUS*), який заміщали консервативними ділянками.

Фрагменти вирізали з *Toro*-вектора, а *GUS* – з *pBI121*. кДНК фрагментів і *pBI121* було вирізано з агарозного гелю для електрофорезу та елюйовано.

Для отримання вектора з однією консервативною ділянкою окремі фрагменти *HC-Pro*, *CIP*, *Nib* або *CP* вбудовували у вектор для трансформації рослин *pBI121*. Для створення плазмід з двома фрагментами

*HC-Pro* та *CIP* вбудовували у *pBI121*. Блок фрагментів *HC-Pro*, *CIP* і *Nib* також було вбудовано в плазмід для одержання конструкції з трьома консервативними ділянками. Наявність фрагмента з трьох консервативних ділянок у векторі перевіряли за допомогою рестрикційного аналізу. Для цього відбирали шість окремих колоній клітин *E. coli*, трансформованих *HC-CIP-Nib/pBI121*. У результаті визначено присутність ділянок ДНК з відповідним розміром фрагментів (рис. 3).

Трансформацію компетентних клітин *A. tumefaciens* супроводжували проведенням ПЛР для аналізу наявності плазмід з консервативними ділянками. Отримані дані свідчать про присутність у клітинах *A. tumefaciens* векторів з ділянками розміром 505 н. для *HC-Pro*, 620 н. для *CIP*, 580 н. для *Nib*, 455 н. для *CP*, 1125 н. для блоку фрагментів *HC-Pro* та *CIP*, 1705 н. для трьох поєднаних ділянок *HC-Pro*, *CIP* і *Nib* (рис. 4).

Таким чином, нами відібрано гени ВМТ, які розділяють найвищий відсоток ідентичності з 31 вірусом роду *Potyvirus*. Консервативні фрагменти чотирьох потівірусних генів було відселектовано з урахуванням гомології нуклеотидної послідовності та наявності важливих функціональних ділянок.

**Висновки.** Здійснено конструювання векторів, які містять одну консервативну ділянку генів *HC-Pro*, *CIP*, *Nib* або *CP* вірусу мозаїки турнепсу. Для порівняння рівня набутої резистентності трансгенних рослин до потівірусів отримано мультигенні конструкції, що містять дві консервативні ділянки *HC-Pro* та *CIP* генів ВМТ, а також створено вектори з трьома консервативними фрагментами генів *HC-Pro*, *CIP* і *Nib*. Одно-, дво- та тригенні конструкції одержано в трансформованих клітинах *A. tumefaciens*.

I. V. Korniiichuk, V. P. Polischuk, S. D. Yeh

Construction of vectors for plant transformation in order to confer resistance to potyviruses

Summary

Genes *HC-Pro*, *CIP*, *Nib*, and *CP* are known to be the most conservative in genome of the potyviruses. The comparison of nucleotide sequences of these genes for 32 viruses of *Potyvirus* genus was carried out. The fragments with the highest percent of identity were selected, amplified from full size cDNA of Turnip mosaic virus (*TuMV*), and inserted into a high-copy *TOPO*-vector, used for the transformation of competent *Escherichia coli* cells. The construction of vectors for plant transformation on the basis of

commercial vector pB1121 was performed. cDNA corresponding to one separate (HC-Pro, CIP, N1b or CP), two (HC-Pro and CIP), and three (HC-Pro, CIP, and N1b) conservative regions was inserted into the vector. The transformed cells of *Agrobacterium tumefaciens* carrying plasmids pB1121 were obtained.

**Keywords:** potyviruses, resistance, cDNA, PCR, plant transformation.

И. В. Корнейчук, В. П. Полищук, Ш. Д. Йе

Создание векторов трансформации растений для получения устойчивости к потивирусам

#### Резюме

Наиболее консервативными среди всех участков генома потивирусов являются гены HC-Pro, CIP, N1b и CP. Проведено сравнение нуклеотидной последовательности данных генов у 32 вирусов рода Potyvirus и отобраны области, отличающиеся самым высоким процентом идентичности. Области амплифицировали с полноразмерной кДНК вируса мозаики турнепса (ВМТ) и встраивали в высококопийный ТОРО-вектор, которым трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli*. Сконструированы векторы трансформации растений на основе коммерческой плазмиды pB1121, в которой встроены кДНК отдельно одного (HC-Pro, CIP, N1b или CP), двух (HC-Pro и CIP) и трех (HC-Pro, CIP и N1b) консервативных участков генов ВМТ. Получены трансформированные клетки *Agrobacterium tumefaciens*, несущие pB1121.

**Ключевые слова:** потивирусы, резистентность, кДНК, ПЦР, трансформация растений.

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Baulcombe D. C. Mechanisms of Pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants // *The Plant Cell*.—1996.—**8**.—P. 1833–1844.
2. Burch-Smith T. M., Schiff M., Liu Y., Dinesh-Kumar S. P. Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.*—2006.—**142**.—P. 21–27.
3. Chumakov M. I. Transfer of genetic information from *Agrobacteria* to bacterial and plant cells: membrane and submembrane structures involved in transfer // *Membrane Cell Biol.*—2000.—**14**.—P. 309–331.
4. Di Nicola-Negri E. Hairpin RNA-mediated silencing of Plum pox virus *PI* and *HC-Pro* genes for efficient and predictable resistance to the virus // *Transgenic Res.*—2005.—**14**.—P. 989–994.
5. Fuchs M., Gonsalves D. Resistance of transgenic hybrid squash ZW-20 expressing the coat protein genes of Zucchini yellow mosaic virus and watermelon mosaic virus 2 to mixed infections by both potyviruses // *BioTechnology*.—1995.—**13**.—P. 1466–1473.
6. Germudsson A., Valkonen J. P. PI- and VPg-transgenic plants show similar resistance to Potato virus A and may compromise long distance movement of the virus in plant sections expressing RNA silencing-based resistance // *Virus Res.*—2006.—**116**.—P. 208–213.
7. Hily J. M. Stability of gene silencing-based resistance to Plum pox virus in transgenic plum (*Prunus domestica* L.) under field conditions // *Transgenic Res.*—2004.—**13**.—P. 427–436.
8. Jan F. J., Fagoaga C., Pang S. Z., Gonsalves D. A single chimeric transgene derived from two distinct viruses confers multi-virus resistance in transgenic plants through homology-dependent gene silencing // *J. Gen. Virol.*—2004.—**81**.—P. 2103–2109.
9. Komari T. Binary vectors and super-binary vectors // *Meth. Mol. Biol.*—2006.—**343**.—P. 15–41.
10. Koonin E. V. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses // *J. Gen. Virol.*—1991.—**11**.—P. 2197–2206.
11. Mahajan S., Dolja V. V., Carrington J. C. Roles of the sequence encoding tobacco etch virus capsid protein in genome amplification: requirements for the translation process and a *cis*-active element // *J. Virol.*—1996.—**70**.—P. 4370–4379.
12. Meynard J. M., Dore T., Lucas P. Agronomic approach: cropping systems and plant diseases // *Cr. Biol.*—2003.—**326**.—P. 37–46.
13. Ratcliff F., Harrison B. D., Baulcombe D. C. A similarity between viral defense and gene silencing in plants // *Science*.—1997.—**276**.—P. 1558–1560.
14. Ravelonandro M. The use of transgenic fruit trees as a resistance strategy for virus epidemics: the plum pox (sharka) model // *Virus Res.*—2000.—**71**.—P. 63–69.
15. Rychahou P. G., Jackson L. N., Farrow B. J., Evers B. M. RNA interference: mechanisms of action and therapeutic consideration // *Surgery*.—2006.—**140**.—P. 719–725.
16. Sanford J. C., Johnson S. A. The concept of pathogen derived resistance: Deriving resistance genes from the parasite's own genome // *J. Theor. Biol.*—1985.—**113**.—P. 395–405.
17. Scorza R. Post-transcriptional gene silencing in plum pox virus resistant transgenic European plum containing the plum pox virus coat protein gene // *Transgenic Res.*—2001.—**10**.—P. 201–209.
18. Shukla D. D., Ward C. W., Brunt A. A. *The Potyviridae* / Ed. D. D. Shukla.—Wallingford: CAB Int., 1994.—P. 1–26.
19. Stram Y., Kuzntzova L. Inhibition of viruses by RNA interference // *Virus Genes*.—2006.—**32**.—P. 299–306.
20. Timmons L. Construction of plasmids for RNA interference and *in vitro* transcription of double-stranded RNA // *Meth. Mol. Biol.*—2006.—**351**.—P. 109–117.
21. Waterhouse P. M., Fusaro A. F. Plant science. Viruses face a double defense by plant small RNAs // *Science*.—2006.—**313**.—P. 54–55.

УДК 578.2

Надійшла до редакції 26.02.07