

Казахский национальный университет имени аль-Фараби

УДК 604.6:578.852

На правах рукописи

АЛЕКСАНДРОВА АЛЁНА МИХАЙЛОВНА

Идентификация белков S-вируса картофеля, супрессирующих РНК-интерференцию, для получения растений, устойчивых к карлавирусам

6D070100 – Биотехнология

Диссертация на соискание
степени доктора философии (Ph.D.)

Научные консультанты:
Искаков Б.К., д.б.н., профессор

Pooggin M.M., Ph.D., INRAE Research
Director

Республика Казахстан
Алматы, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ.....	5
ОПРЕДЕЛЕНИЯ	6
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	7
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	12
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Картофель в Казахстане и в мире	12
1.2 Вирусные болезни картофеля.....	12
1.2.1 S-вирус картофеля (<i>Potato Virus S, PVS</i>).....	15
1.2.2 Методы обнаружения вирусов картофеля.....	17
1.2.3 Фитоиммунитет	18
1.2.4 Методы уничтожения основных вирусов картофеля.....	18
1.2.4.1 Культура меристемного размножения картофеля для элиминации вирусных инфекций.....	19
1.2.4.2 Химиотерапия для эрадикации картофельных вирусов.....	19
1.2.4.3 Термотерапия картофеля <i>in vitro</i>	19
1.2.4.4 Электротерапия картофеля <i>in vitro</i>	20
1.3 Гены растений, обеспечивающие устойчивость к вирусам	21
1.4 РНК-интерференция (РНКи)	22
1.4.1 История открытия.....	22
1.4.2 РНКи в растениях.....	22
1.4.3 Вирус-индуцированное замолкание генов	24
1.4.4 Короткие интерферирующие РНК (киРНК)	25
1.4.5 Амплификация и системное распространение РНКи.....	25
1.4.6. Общие пути РНК-интерференции (РНКи)	26
1.4.7 Путь РНКи	26
1.4.8 Компоненты пути РНКи	27
1.4.8.1 Dicer-подобные белки (<i>DCL</i>).....	27
1.4.8.2 Белки семейства <i>Argonaute</i> (<i>AGO</i>).....	28
1.4.8.3 Белки РНК-зависимой РНК-полимеразы (<i>RDR</i>).....	28
1.5 Механизм РНК-интерференции растений и взаимодействие с вирусами	30
1.5.1 Механизм подавления РНК растений против вирусов	30

1.5.2	Антивирусная роль РНК-интерференции. Биогенез вирус-индуцированных <i>кiРНК</i> (<i>vsіРНК</i>).....	31
1.5.3	Эффекторный этап антивирусного молчания	32
1.5.4	Усиление молчания.....	33
1.6	Стратегии подавления РНК-интерференции вирусами (супрессия)	34
1.6.1	Вирусные супрессоры блокируют молчание растительной РНК	35
1.6.2	Секвестрация вирус-индуцированных <i>кiРНК</i> (<i>vsіРНК</i>)	36
1.6.3	Подавление усиления антивирусного молчания.....	36
1.7	Стратегии трансгенной резистентности	37
1.7.1	Вмешательство гетерологичных вирусных генов	37
1.7.2	Посттранскрипционное молчание генов.....	38
1.7.3	Резистентность, опосредованная белками оболочки	38
1.7.4	Антисмысловая и смысловая РНК.....	39
2.	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	41
2.1	Материалы исследований	41
2.2	Методы исследований	41
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	49
3.1	Вирусы картофеля в двух регионах Казахстана.....	49
3.1.1	Одинокная и комплексная вирусная инфекция.....	51
3.1.2	Сравнение эффективности методов ИФА и РОТ-мнПЦР.....	52
3.1.3	Компьютерный анализ геномной РНК PVS.....	53
3.1.4	Разнообразие изолятов PVM и PVS в Республике Казахстан	56
3.1.5	Разнообразие изолятов PVS в Казахстане	58
3.1.6	Диагностика различных штаммов PVS методом РОТ-мнПЦР.....	60
3.2	Клонирование ОРС2-ОРС6 PVS в состав бинарного агробактериального вектора <i>pBIN19</i>	62
3.2.1	Транзientная экспрессия ОРС2-ОРС6 двух казахстанских изолятов PVS в системе <i>Nicotiana benthamiana</i> 16с.....	65
3.2.2	Молекулярная диагностика супрессионной активности белков CP и 25K двух казахстанских изолятов PVS с помощью <i>northern</i> -блот анализа	68
3.3	Получение картофеля, устойчивого к карлавирусам.....	71
3.3.1	Создание рекомбинантных ДНК для стабильной трансформации и получения вирус-резистентных растений картофеля	71
3.3.3	Получение штаммов агробактерий, несущих последовательности <i>gРНК</i> PVS.....	80

3.3.4 Результаты трансформации растений картофеля	81
3.3.5 Тестирование трансгенного картофеля на устойчивость к PVS в лабораторных условиях	86
3.3.6 Оздоровление зараженного вирусами картофеля с помощью трансформации.....	90
3.3.7 Полевые испытания трансгенных растений на устойчивость к вирусам	93
3.4 Молекулярные доказательства трансген-опосредованной РНК-интерференции	96
3.4.1 Блот-гибридизация малых РНК	96
3.4.2 Анализ секвенирования <i>Plumina</i> тотальных РНК трансгенных растений.....	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	113
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	116

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

1. Закон Республики Казахстан «О науке» от 18.02.2011 г. №407-IVЗРК.
2. ГОСО РК 5.04.034-2011. Государственный общеобразовательный стандарт образования Республики Казахстан. Послевузовское образование. Докторантура. Основные положения (изменения от 23 августа 2012 г. №1080).
3. ГОСТ 7.1-2003. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяются следующие термины с соответствующими определениями:

РНК-интерференция – процесс подавления экспрессии гена на стадии транскрипции, трансляции, посредством деаденилирования или деградации РНК при помощи малых молекул РНК.

Супрессор РНК-интерференции – белок, способный подавлять РНК-интерференцию.

микроРНК (миРНК) – малые некодирующие молекулы РНК длиной 18-25 нуклеотидов, обнаруженные у растений, животных и некоторых вирусов, принимающие участие в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов путём РНК-интерференции.

киРНК (короткие интерферирующие РНК) – это класс двухцепочечных РНК, длиной 20-25 нуклеотидов. Взаимодействие малых интерферирующих РНК с матричной РНК целевого гена приводит к деградации последней, предотвращая трансляцию мРНК на рибосомах в кодируемый ею белок. Одна из разновидностей миРНК.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

AGO	Argonaute белки, участвующие в RISC
CaMV	вирус мозаики цветной капусты
CMV	вирус мозаики огурца (Cucumber mosaic virus)
CP	белок оболочки вируса
DCL	DICER-подобные белки
GFP	зеленый флуоресцентный белок (Green Fluorescent Protein)
HR	реакция гиперчувствительности растений
PLRV	вирус скручивания листьев картофеля, ВСЛК (Potato leaf roll virus)
PVM	M вирус картофеля (Potato virus M)
PVS	S вирус картофеля (Potato virus S)
PVX	X вирус картофеля (Potato virus X)
PVY	Y вирус картофеля (Potato virus Y)
RDR	РНК-зависимая РНК-полимераза растений
RdRP	РНК-зависимая РНК-полимераза вирусов (RNA-dependent RNA polymerase)
RISC	РНК-индуцированный комплекс молчания
TGBp	белок, кодируемый в тройном блоке генов у <i>Alfalexiviridae</i> , <i>Betaflexiviridae</i> (Triple Gene Block protein)
TMV	вирус табачной мозаики (Tobacco mosaic virus, TMV)
UTR	нетранслируемая последовательность (Untranslated Region)
vsРНК	вирус-индуцированные короткие интерферирующие РНК
VSR	вирусный белок супрессор
гРНК	геномная РНК
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
дцРНК/ДНК	двухцепочечная РНК/ДНК
ИФА	иммуноферментный анализ
кДНК	копия ДНК (сDNA)
киРНК	короткие интерферирующие РНК
миРНК	малые РНК, участвующие в РНК-интерференции
нт	пара комплементарных нуклеотидов
ОРС	открытая рамка считывания
оцРНК/ДНК	одноцепочечная РНК/ДНК
ПТМГ	посттранскрипционное молчание генов (Post-Transcriptional Gene Silencing)
РНК	рибонуклеиновая кислота
РНКи	РНК-интерференция, сайленсинг РНК
РОТ-мпПЦР	реакция обратной транскрипции и мультиплексной ПЦР
ТМГ	транскрипционное молчание генов (Transcriptional Gene Silencing)

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика работы. Работа посвящена изучению потенциальной супрессорной активности белков S-вируса картофеля (PVS), его распространению в различных областях Казахстана, взаимодействию PVS с клетками растения-хозяина и разработке способов защиты картофеля от заражения вирусами.

Картофель является одной из самых популярных сельскохозяйственных культур, возделываемых по всему миру, а также одной из наиболее подверженных заражению различными патогенами, поскольку размножение его осуществляется вегетативным способом (клубнями). Растения картофеля поражаются более чем 30-ю различными вирусами, из которых наибольший экономический ущерб наносят вирус скручиваемости листьев картофеля (ВСЛК, Potato Leaf Roll Virus, PLRV), X-, M-, S- и Y-вирусы картофеля (Potato virus X, M, S и Y (PVX, PVM PVS и PVY)). PVS и PVM относятся к одному роду *Carlaviruses* и являются наименее изученными из упомянутых выше, однако самыми распространенными на территории Казахстана в настоящее время. Экономический ущерб вирусных заболеваний картофеля оценивается в потерях урожая до 75% в тяжелых случаях комплексных вирусных инфекций. Методы оздоровления и получения вирусостойчивых сортов картофеля все еще не обладают достаточной эффективностью. С этой точки зрения, использование генно-инженерных подходов в данной области является наиболее перспективным направлением по созданию исходных линий для дальнейшей работы по селекции картофеля.

РНК-интерференция представляет собой природный клеточный механизм регуляции транскрипта клетки, одной из функций которого является борьба с вирусными инфекциями. На сегодняшний день изучение регуляции транскрипта клетки является одним из наиболее актуальных направлений исследований молекулярной биологии. Функциями этого процесса является не только регуляция транскрипции, экспрессии и посттранскрипционного замалчивания генов, но также и защита от эндогенных и чужеродных молекул РНК, представителями которых являются вирусы. Большинство растительных вирусов содержат в качестве носителя генетической информации молекулу РНК, взаимодействие которой с клеткой хозяина так же осуществляется на уровне её транскрипции и трансляции. Вирусы, в свою очередь, противодействуют клеточному процессу РНК-интерференции, подавляя её белками супрессорами. Изучение взаимодействия вирусов между собой и клетками хозяина позволяет разработать эффективные способы борьбы с вирусными инфекциями и повысить урожайность сельскохозяйственных культур (картофеля) в несколько раз.

Объектом исследования служил S-вирус картофеля (PVS), его геномная (г)РНК и кодируемые ею белки. Кроме того, исследовались разные сорта картофеля, культивируемые в Казахстане.

Предметом исследования являлись оценка супрессорных свойств белков вируса PVS, и возможность запуска механизма РНК-интерференции у трансгенных растений, для защиты картофеля от заражения карлавирусами.

Цель работы: установить специфические белки S вируса картофеля (PVS), вызывающие супрессию процесса РНК-интерференции в зараженных клетках растения-хозяина и, используя методы геной и клеточной инженерии, разработать биотехнологию создания растений картофеля с генетически закрепленной устойчивостью к PVS и другим фитопатогенным вирусам.

Задачи исследования:

1. Определить присутствие PVS в Алматинской и Костанайской областях Республики Казахстан. Провести секвенирование нуклеотидной последовательности, кодирующей белок оболочки вируса PVS для идентификации изолятов PVS, распространенных в этих регионах.
2. Создать рекомбинантные ДНК, кодирующие аминокислотные последовательности пяти белков вируса PVS (25К, 7К, 12К, белок оболочки (СР) и 11К) на основе вектора pBIN19 для транзientной экспрессии в индикаторных растениях табака *Nicotiana benthamiana* линии 16с и проанализировать их на способность к подавлению РНК-интерференции.
3. На основе бинарного агробактериального вектора pCAMBIA2300 создать интрон-шпилечные ДНК-конструкции, кодирующие последовательности белка оболочки (СР) и 25К белка PVS для стабильной генетической трансформации растений картофеля. Тестировать полученные трансгенные растения на присутствие вирусов и отобрать устойчивые и оздоровленные линии растений.

Научная новизна исследования. Впервые была проведена работа по идентификации супрессорной активности у белков PVS, которая оказалась на низком уровне. В результате исследований был разработан новый метод оздоровления картофеля на основе стимуляции естественного механизма РНК-интерференции и получены убедительные доказательства эффективности данного подхода к оздоровлению и получению генетически-устойчивых к вирусам растений картофеля. Посредством секвенирования микро(ми)РНК и последующей реконструкции вирусных последовательностей в трех трансгенных линиях картофеля было доказано, что именно трансген-опосредованные короткие интерферирующие (ки)РНК вызывают резистентность к вирусному заражению.

Теоретическая значимость работы состоит в оценке разнообразия изолятов вируса PVS на территории Республики Казахстан и изучении взаимодействия слабо изученного вируса PVS с клеткой хозяином. В результате работы в базу данных NCBI GenBank было депонировано 3 полногеномные последовательности казахстанских изолятов PVS (MK442089, ON583978, MN095414) и 2 полногеномные последовательности вируса PVY (ON583979, ON583980).

На основе использования интрон-шпилечных рекомбинантных ДНК-конструкций был разработан новый метод оздоровления зараженного вирусными инфекциями картофеля.

Практическая значимость работы. Полученные в ходе выполнения работы результаты могут быть использованы для разработки биотехнологии

получения новых сортов и гибридов картофеля с генетически закрепленной устойчивостью к определенным вирусным инфекциям, а также как один из инструментов оздоровления картофеля. Использование полученных таким способом растений, в качестве посадочного материала, позволит сократить использование дорогих инсектицидных препаратов для защиты картофеля от поражения тлей – основным переносчиком вирусных инфекций, что приведет к повышению урожайности и продуктивности картофеля.

В настоящее время внедрение новых подходов к повышению продуктивности агрокультур посредством развития устойчивости к различным инфекциям является перспективным направлением. Причин тому существует несколько – изменение климата, интенсификация сельского хозяйства, усиление продовольственной безопасности за счет выращивания собственных районированных сортов сельхоз культур, постоянное развитие резистентности у насекомых к применяемым средствам химической защиты растений и т.д. Предложенный в работе метод получения вирусоустойчивых растений может найти широкое применение в биотехнологии и сельском хозяйстве, поскольку, в результате генетической трансформации отсутствует продукт экспрессии трансгена в виде протеина, что позволяет предположить отсутствие негативных последствий использования таких генетически-модифицированных организмов в качестве продукта питания человека и корма для сельскохозяйственных животных.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Наиболее распространенными вирусными инфекциями в Казахстане являются PVS (более 35%) и PVM (более 80%) – представители рода *Carlavirus*. PVS чаще всего встречается в комплексной инфекции с PVM. На территории Казахстана существует широкое разнообразие изолятов PVS, относящиеся к двум штаммам – Ordinary («Fortune», NCBI GenBank acc. nos. MK442089; «PVS_ALYU-75» ON583978) и Andean (Ushkonur, MN095414).
2. Белок оболочки (CP), а также белки 25K и 11K вируса PVS^A (Andean) проявляют слабую супрессорную активность на грани детекции в условиях транзientной экспрессии в индикаторных растениях табака *Nicotiana benthamiana* линии 16с. У белков штамма PVS^O (Ordinary), синтезируемых с 2-ой по 6-ю открытые рамки считывания (ОРС) выраженных супрессорных свойств в этой системе зарегистрировать не удалось.
3. Использование интрон-шпилечных ДНК-конструкций в качестве индуктора РНК-интерференции способствовало развитию множественной устойчивости к родственным вирусам у трансгенного картофеля, а также обеспечивает оздоровляющий эффект на заражённых растениях на уровне малых РНК.

Связь диссертационной работы с научными исследованиями. Научные исследования диссертационной работы выполнены в рамках научно-исследовательских проектов AP05131133 «Выявление белков s вируса картофеля, подавляющих процесс РНК-интерференции клеток хозяина, с целью

исследования молекулярных механизмов взаимодействия вируса и растения и оздоровления вирусного материала» и OR11465447 «Оценка эпидемиологической ситуации вирусных поражений картофеля в различных регионах Казахстана и выявление молекулярно-генетических особенностей местных изолятов».

Апробация, одобрение результатов работы и личный вклад автора. Результаты работы опубликованы в 27 печатных изданиях, в том числе 4 статьи были опубликованы в международных рецензируемых журналах с высоким рейтингом и индексом цитирования. По результатам проделанной работы было получено 3 патента Республики Казахстан. Личный вклад автора был основным в опубликованных работах.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация изложена на 136 страницах, состоит из определений, обозначений и сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, списка использованных источников.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Картофель в Казахстане и в мире

Картофель является одной из самых популярных сельскохозяйственных культур, возделываемых во всем мире. Он употребляется не только как пищевой продукт, но также используется в качестве корма для сельскохозяйственных животных и как ценное сырье для пищевой и легкой промышленности. Культивируемый картофель [1] генетически представляет собой невероятно разнообразную культуру, хотя практически весь картофель, выращиваемый и используемый в коммерческих целях во всем мире, представляет собой тетраплоидные сорта картофеля ($2n=4x=48$), диплоидный, триплоидный, тетраплоидный и даже пентаплоидный картофель местных сортов все еще выращивают в южноамериканских Андах. Картофель в настоящее время выращивается примерно на 19 миллионах гектаров сельскохозяйственных угодий по всему миру, мировое производство картофеля составляет примерно 378 млн тонн.

Картофелеводство в Республике Казахстан традиционно развито в северо-восточных и юго-восточных регионах (Рисунок 1.1). Наибольшую посевную площадь картофель занимает в Алматинской, Павлодарской и Туркестанской областях. В 2021 году посевные площади всех сельскохозяйственных культур составили 22,9 млн га, из них картофель выращивался на 195,8 тыс. га. В соответствии с данными Бюро национальной статистики Агентства по стратегическому планированию и реформам Республики Казахстан в 2021 году собрано 4,0 млн тонн картофеля при урожайности 207,4 ц/га (при среднемировой урожайности около 250 ц/га) [2].

Урожайность картофеля зависит от нескольких факторов: 1) качество посадочного (семенного) материала, 2) агротехника и 3) влияние погодных условий. Среди перечисленных условий первостепенное значение имеет качество посадочного материала, поскольку картофель размножают вегетативно, т.е. посредством клубней. При этом способе размножения семенной материал накапливает патогены (вирусы, бактерии, грибки, нематоды и т.д.) влияющие на урожайность в целом, в результате нескольких репродукций происходит так называемое вырождение картофеля. Изучение взаимодействия вирусов с растением-хозяином, и развитие различных стратегий борьбы с вирусными инфекциями позволяет добиться ощутимых результатов и повысить урожайность этой важнейшей продовольственной культуры.

1.2 Вирусные болезни картофеля

Среди всех патогенов, поражающих картофель, особое место занимают вирусы. Картофель поражается более чем 50-ю различными вирусными инфекциями, из которых часть распространены только локально (в основном, в местах естественного произрастания дикого картофеля), а часть имеют общемировое распространение [3]. Среди таких вирусов наибольшее распространение как в мире, так и в Казахстане имеют Y вирус картофеля (*Potato*

Virus Y, PVY, род *Potyvirus*, семейство *Potyviridae*), X вирус картофеля (*Potato Virus X*, PVX, *Potexvirus*, *Alphaflexiviridae*), вирус скручиваемости листьев картофеля (*Potato Leaf Roll Virus*, PLRV, *Polerovirus*), M вирус картофеля (*Potato Virus M*, PVM) и S вирус картофеля (*Potato Virus S*, PVS, оба относятся к роду *Carlavirus*, семейство *Betaflexiviridae*). Вирусы представляют собой крошечные патогены растений, состоящие из белка оболочки и нуклеиновой кислоты – ДНК или РНК, чаще всего растительные вирусы содержат РНК в качестве генетического материала.

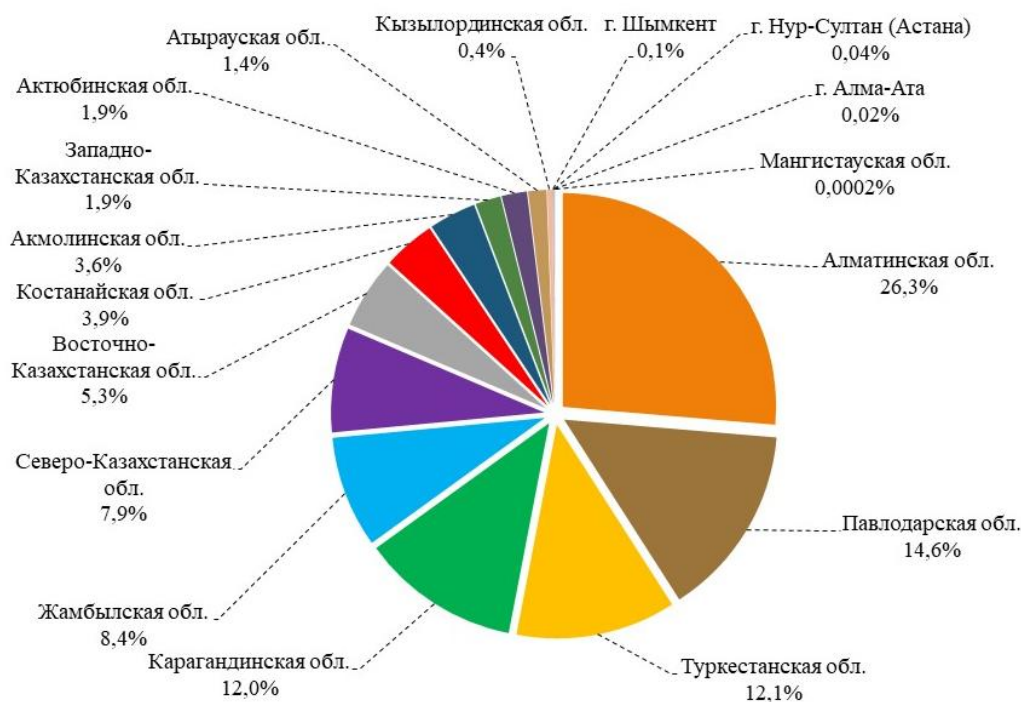


Рисунок 1.1 – Структура посевных площадей в промышленном секторе картофелеводства Казахстана в 2019 г. (% от общей площади посевов 86,2 тыс. га) [4, 5].

В глобальном масштабе точные данные об экономических потерях, вызванных вирусами картофеля, отсутствуют, но потери, вызванные вирусами растений, оцениваются более чем в миллионы долларов в год во всем мире. Приблизительные данные показывают, что вирусы картофеля могут вызывать до 50% потерь урожая клубней [2]. Обычно потери урожая клубней составляют 5–15%, если все растения вторично заражены PVX и PVS; 15–30 % при 100 % вторичном заражении PVY некротического штамма (PVY^N) и 40–70 % при инфицировании PLRV. Тяжелые штаммы PVY и PLRV могут снижать урожайность до 80%, в то время как легкие вирусы, такие как PVX, PVS и PVM, могут вызывать потерю урожая до 30% [6].

В то же время отсутствуют данные о снижении урожайности картофеля в связи с вирусными болезнями на территории Казахстана. Nikolaeva с соавт. [7] сообщает, что в Восточном Казахстане в 2019-2021 гг. наблюдалось присутствие

двух вирусных инфекций PVY и PVS. Khassanov с соавт. [8] приводит результаты мониторинга присутствия трех рекомбинантных штаммов вируса PVY на территории Восточного Казахстана, согласно которым было обнаружено присутствие вирусной инфекции у 7% изученных образцов картофеля диагностирован вирус. Более ранние исследования Loebenstein с соавт. [9] сообщают о распространении пяти вирусных инфекций (PLRV, PVX, PVM, PVS и PVY) в Казахстане, причем, приводятся данные о потерях в урожайности картофеля при заражении карлавирусами PVM и PVS на уровне около 57%. По данным Khassanov и Vologin [10] вирус PVS является одним из самых распространенных в Казахстане.

PVY и PLRV в настоящее время являются наиболее опасными вирусами картофеля во всем мире [11], причем PVY обогнал PLRV как наиболее важный (Рисунок 1.2). Потери урожая клубней вызываются любым из них при единичных инфекциях и могут достигать более 80% при сочетании с другими вирусами. PVX широко распространен во всем мире и вызывает потери 10-40% при одиночных инфекциях и особенно опасен при сочетании с PVY или PVA. Это связано с его синергизмом с обоими потивирусами, что приводит к потере урожая клубней до 80%. PVS также часто встречается во всем мире, но обычно вызывает лишь незначительные потери урожая клубней, если только не присутствуют тяжелые штаммы или они не представлены в смешанной инфекции с PVX. PVA сам по себе может вызвать потери урожая до 40%, но гораздо менее распространен, чем PVY, PVS или PLRV. PVM относительно редко встречается в большинстве стран и, как и PVS, в большинстве случаев вызывает лишь незначительные потери урожая клубней, за исключением смешанной инфекции, вызванной PVX или другими вирусами. Помимо снижения урожайности, некоторые вирусы наносят экономический ущерб, влияя на качество картофеля, в частности, вызывая некроз внутренних и поверхностных клубней. PLRV иногда вызывает некроз сосудистой системы клубня, известный как «сетчатый некроз». Некроз клубней, состоящий из некротических колец или дуг в мякоти, иногда развивается при передающемся трипсами вирусе TSWV и при переносимых через почву вирусах, такими переносчиками как нематоды.

Lin и соавт. [12] обнаружили, что инфекция PVS сделала сорта, устойчивые к фитофторозу (*Phytophora infestans*), более восприимчивыми к этой инфекции. Среди наиболее важных вирусов PVY, PLRV, PVA, PVS и PVM все передаются тлями.

Можно назвать два основных подхода к борьбе с вирусными инфекциями картофеля – воздействующие внешне (химические и биопрепараты) и внутренние (фитоиммунитет). К химическому подходу следует отнести инсектициды, инсектоакарициды и пестициды и другие отравляющие вещества, воздействующие на основных переносчиков вирусных болезней – тлей.

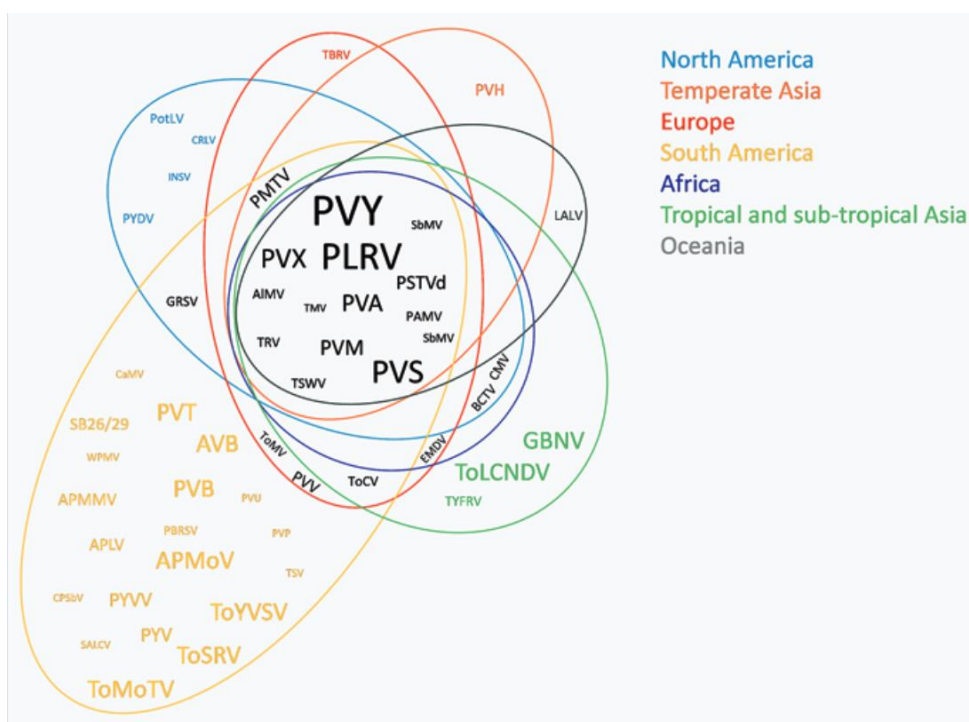


Рисунок 1.2 – Диаграмма географического распределения наиболее распространенных вирусов картофеля во всем мире. Их относительная важность/распространенность в глобальном масштабе или на региональном уровне, если они географически ограничены, иллюстрируется размером аббревиатуры вируса [11].

В то время как стратегия развития фитоиммунитета подразумевает под собой получение устойчивых растений. Этот подход позволяет не только получать экологически чистый сельскохозяйственный продукт, но и способствует значительной экономии в агротехнике выращивания, поскольку отсутствует необходимость постоянной обработки посевов химическими препаратами.

1.2.1 S-вирус картофеля (*Potato Virus S*, PVS)

PVS является представителем рода *Carlavirus* семейства *Betaflexiviridae*, переносится тлей в непersistентной манере и поражает растения семейств *Solanaceae* и *Chenopodiaceae* [13]. Различают два штамма вируса PVS^O (Ordinary) и PVS^A (Andean) в зависимости от их способности вызывать несистемную или системную инфекцию у растений *Chenopodium* spp., соответственно. Чаще всего, PVS вызывает бессимптомное заболевание у большинства сортов картофеля, хотя у некоторых сортов наблюдаются визуальные признаки инфекции, такие как шероховатость, слабая мозаичность или бронзовость, которые приводят к образованию некротических пятен и отставанию в растений росте [13, 14]. Этот вирус приводит к потерям урожая на 10-15%, а комбинированная инфекция с PVS усугубляет выраженность симптомов, вызванных присутствием второго вируса. Так смешанная инфекция PVS+PVX приводит к сокращению урожайности на 15-34%, а количество клубней сокращается на 16-26% [15].

Основными переносчиками PVS являются несколько видов тлей, включая *Aphis fabae*, *A. nasturtii*, *Myzus persicae* и *Rhopalosiphum padi*, причем некоторые изоляты не переносятся тлей, но другие легко передаются [16]. PVS не передается семенами, однако передается механическим путем от инфицированных к здоровым полевым растениям картофеля [17]. Несмотря на то, что вирус имеет очень ограниченный круг естественных хозяев, его экспериментально передавали путем механической прививки не менее чем 56-ти другим пасленовым и до 33-м видам в 12 других семействах [18]. Полезными видами растений-индикаторов вируса являются: *Chenopodium album*, *C. amaranticolor*, *C. quinoa* – вызывающий хлоротические локальные поражения, часто с зеленым ореолом на старых листьях. Штамм PVS^A заражает *C. quinoa* системно и вызывают хлоротическую пятнистость, однако PVS^O инфицирует лебеду только локально.

Геномная РНК (гРНК) PVS представлена положительно ориентированной одноцепочечной мРНК длиной около 8535 нт и имеет кеп-структуру на 5'-конце и поли(А)-хвост на 3'-конце (Рисунок 1.3) [19-21].

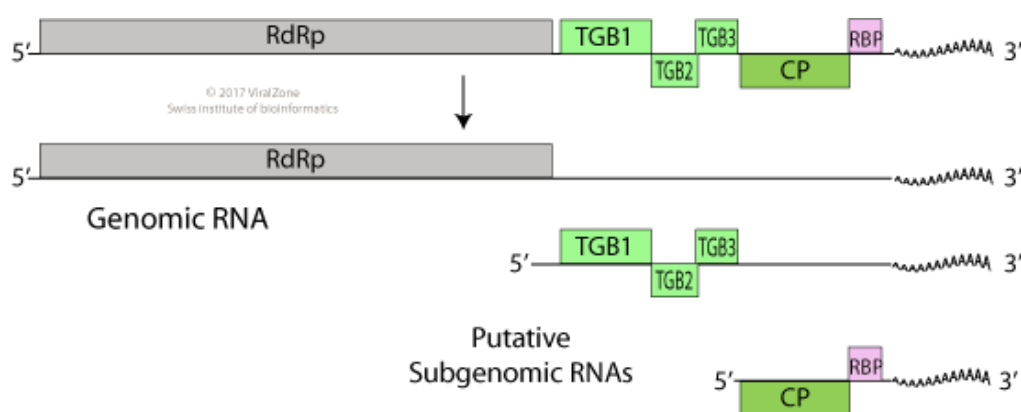


Рисунок 1.3 – Организация генома карлавирусов. В процессе трансляции образуется три субгеномные РНК: 1) кодирующая полипротеин, массой 223 кДа, 2) TGB-блок и 3) CP + RBP (11К) [22].

В гРНК PVS выявлено шесть открытых рамок считывания (ОРС). ОРС1 кодирует полипротеин размером 223 кДа, внутри которого находятся последовательности кодирующие метилтрансферазу, протеазу, хеликазу и РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRP). ОРС2, ОРС3 и ОРС4 кодируют белки 25 кДа, 12 кДа и 7 кДа, входящие в тройной генный блок (triple-gene-block, TGB-блок), характерный для всех карлавирусов [23, 24]. Эти белки отвечают за распространение вируса из клетки в клетку и имеют область значительной гомологии с последовательностями представителей группы потексвирусов. ОРС5 кодирует белок оболочки (CP, coat protein) размером 34 кДа и имеет наиболее консервативную последовательность (обнаружено 59 % гомологии с

потексвирусами) [20, 21]. ОРС6 кодирует богатый цистеинами белок 11 кДа, который обладает РНК-связывающей активностью (RNA binding protein, RBP).

Показано, что вирус также формирует в минорных количествах две субгеномные РНК (сгРНК) размером 2,5 тыс. нт и 1,5 тыс. нт (см. Рисунок 1.3), первая из которых кодирует белки TGB-блока 25 кДа, 12 кДа и 7 кДа, а вторая сгРНК – два белка, белок оболочки 34 кДа и белок 11 кДа [25]. С помощью проведенного кластерного анализа аминокислотных последовательностей обнаружен ряд отличий в аминокислотных последовательностях PVS^O и PVS^A [26].

Поскольку PVS является РНК-содержащим вирусом, для его детекции применяют как иммуноферментный анализ (ИФА), так и методы молекулярной диагностики, основанные на гибридизации со специфическими РНК- и ДНК-зондами. Кроме того, часто применяется комбинация реакции обратной транскрипции (РОТ) с последующей полимеразной цепной реакцией (ПЦР), используемые для большинства вирусов картофеля.

1.2.2 Методы обнаружения вирусов картофеля

Для обнаружения и борьбы с вирусами картофеля необходимы чувствительные, быстрые и экономичные методы детекции инфекций. Методы обнаружения вирусов в растительных тканях можно разделить на серологические, детекции нуклеиновых кислот, и их модификации. Иммуноферментный анализ (ИФА) как рутинный метод исследования для подтверждения вирусного статуса меристемных культур на основе серологических свойств. Он обладает рядом преимуществ, таких как низкая стоимость, возможность проводить анализ в полевых условиях, автоматизация проведения. Серологические методы обнаружения вирусов картофеля: ИФА, тканевой иммуноанализ (ТВИА от Tissue Blot Immuno Assay) и микробаланс иммуносенсорный на кварцевых кристаллах (QСMІ от Quartz Crystal Microbalance Immunosensors) разработаны и используются для рутинной диагностики. Эти методы обладают более низкой чувствительностью к вирусным частицам, чем методы молекулярной диагностики [27].

Молекулярные методы детекции нуклеиновых кислот, такие как ПЦР, используются для обнаружения вирусов на молекулярном уровне. Дот-иммуноанализ связывания (DІВА), мультиплексный иммуноанализ микросфер (MІА), обратная транскрипция и петлевая изотермическая амплификация (RTLAMP) и секвенирование следующего поколения считаются альтернативными передовыми методами, но требуют соответствующего опыта для выявления и идентификации различных вирусов картофеля [28]. По сравнению с серологическими, методы молекулярной биологии, такие как реакция обратной транскрипции сопряженная с полимеразной цепной реакцией (РОТ-ПЦР) более надежны, специфичны, чувствительны и дешевле, с их помощью разработаны методики мультиплексной РОТ-ПЦР (РОТ-мпПЦР) для детекции сразу пяти вирусов PVM, PVS, PVX, PVY и PLRV [29].

1.2.3 Фитоиммунитет

Основатель учения об иммунитете растений Н. И. Вавилов, положивший начало изучению его генетической природы, считал, что устойчивость растений к возбудителям болезней выработалась в процессе тысячелетней эволюции в центрах происхождения [30]. Иммуитет растений контролируется сравнительно небольшим числом генов, поддающихся учету при гибридологическом анализе. Известно, что устойчивость или восприимчивость растений представляют собой результат взаимодействия двух геномов (растения и паразита), что объясняет многообразие как генов устойчивости растений к одному и тому же виду возбудителя, так и физиологических рас патогена, способных преодолеть действие этих генов. Подобное многообразие является следствием параллельной эволюции паразита и растения-хозяина.

Изучение защитных механизмов растений в ответ на патогены в середине XX века привело к формированию теории фитоиммунитета, которая признана центральной в изучении иммунитета растений [31]. Согласно этой теории, исход взаимодействий в фитопатосистемах находится под генетическим контролем [32]. Это означает, что в процессе коэволюции растение-хозяин и его паразит развивают комплементарные пары генов: ген устойчивости (R) у растения и ген авирулентности (Avr) у паразита. Изучение этих генов ржавчины льна побудило американского фитопатолога Гарольда Флора разработать концепцию «ген за геном». Этот тип резистентности контролируется моногенетически, при этом возбудитель и его хозяин, как правило, обладают одним и тем же географическим положением. центры зарождения и развиваются параллельно.

Четыре типа факторов были описаны в теории «ген за геном»: 1) гены Avr и их продукты (элиситоры), 2) гены устойчивости и их продукты (рецепторы), 3) преобразователи сигналов, передающие информацию геном; 4) гены иммунного ответа и их продукты (белки, связанные с патогеном, фитоалексины, лигнин и др.). Первые две группы специфичны; последние неспецифичны. Таким образом, в соответствии с классическим представлением об иммунитете растений взаимодействие продуктов R- и Avr-генов, рецепторов и элиситоров приводит к развитию реакции гиперчувствительности (HR) и определяет устойчивость растений к патогену.

1.2.4 Методы уничтожения основных вирусов картофеля

Картофель – первая крупная продовольственная культура, для которой биотехнологические методы культуры *in vitro* были применены для получения безвирусных проростков [27, 28]. Помимо применения методов генной инженерии для развития устойчивости картофеля к вирусам [33], методы *in vitro* являются наиболее практичными для сохранения генотипа сортового картофеля.

Для уничтожения вирусов растений было использовано несколько методов: криотерапия, электротерапия, культура меристем, термотерапия и химиотерапия – являются основными методами, используемыми во многих странах. Предыдущие работы продемонстрировали, что термотерапия и/или химиотерапия являются наиболее важными и надежными способами получения безвирусных растений из клонально размножающегося инфицированного

картофеля [34], а также меристемное размножение в качестве рутинного метода получения безвирусного картофеля [35]. Криотерапия более быстрый, эффективный и простой способ выращивания картофеля безвирусных растений, чем культура меристем [36, 37].

1.2.4.1 Культура меристемного размножения картофеля для элиминации вирусных инфекций

Использование меристемной культуры заключается в культивировании на питательной среде небольшого (0,1–0,5 мм) фрагмента ткани, выделенной из меристематической зоны. Кончики побегов и корневая ткань являются подходящими органами для культуры меристем, из-за их высокого потенциала клеточного деления. Этот метод считается рутинным и основным среди стандартных методов оздоровления картофеля от вирусов [38]. При использовании меристемной культуры картофеля продукция семенного материала выдается в короткие сроки и не зависит от сезона года [39]. Размер выделяемых меристем, сорт и вид культуры, и разновидности вирусных инфекций являются основными факторами, которые часто влияют на успех уничтожения растительных вирусов в тканях [6]. Для элиминации вирусов картофеля размер меристемы определяет долю элиминации вируса и скорость получения безвирусного картофеля, она обратно пропорциональна размеру меристемы, это, вероятно, объясняется более низким содержанием вируса в более мелких клетках меристемы. Техника микроклонального размножения используется во многих странах для производства семенных клубней картофеля благодаря его способности к быстрому клонированию и длительному хранению растений картофеля [40]. Однако тот факт, что выделение и культивирование такого небольшого фрагмента меристемы (0,1–1 мм) часто вызывает проблемы [41] и может привести к нежелательным соматическим вариациям, культура меристем сочетается с другими методами, такими как термотерапия или химиотерапия для увеличения выработки свободных от вирусов проростков картофеля [41; 42].

1.2.4.2 Химиотерапия для эрадикации картофельных вирусов

Уничтожение вирусов растений с помощью противовирусных препаратов является важным методом производства безвирусных проростков [28]. Он прост и легко сочетается с рутинной техникой меристемной культуры, это очень помогает в элиминации вирусов картофеля PVX, PVY, PVM, PLRV. В литературе показано, что рибавирин является наиболее перспективным противовирусным препаратом против вирусов растений картофеля [43]. Эффективность элиминации вирусов противовирусными препаратами пропорциональна их концентрации и к форме их применения [39].

1.2.4.3 Термотерапия картофеля in vitro

Термотерапия является одним из традиционных методов оздоровления, используемых для элиминации вирусных инфекций растений картофеля, а также для уменьшения концентрации вируса, для которого существует связь между

температурой и подавлением вирусной РНК [37]. Он применялся против ряда вирусов, принадлежащих более чем 13-ти семействам различных вирусов [44]. Сообщалось, что термочувствительность некоторых вирусов ниже чем у растительных клеток, и что повреждения, причиняемые тканям растений тепловым стрессом могут переноситься легче, чем повреждения, вызванные вирусами [45]. Наличие вирусной РНК в растительной клетке вызывает выработку естественного противовирусного ответа через механизм РНК-интерференции и посттранскрипционное замалчивание генов, вызванное вирусами [46-48]. Отчеты обнаружили, что вирус-индуцированное молчание генов неэффективно работает при низкой температуре, следовательно, чем выше температура, тем сильнее повышается способность иммунной системы к защите хозяина [44]. В результате проведенных исследований обнаружено, что существует тесная связь между температурой и молчанием РНК. Однако методика термотерапевтического лечения потенциально эффективна для элиминации присутствующих вирусных частиц в клетках, но низкоэффективна в отношении новых синтезированных вирусных частиц [44]. Термотерапия как способ уничтожения вирусов картофеля в значительной степени зависит от сорта, типа вируса и продолжительности обработки, а также влияет на выживаемость проростков [49].

Уничтожение вирусов картофеля термотерапией является селективной и неэффективной для сферических вирусов [50]. Одновременное применение противовирусных агентов и температура, а также другие комбинации существенно повышают эффективность оздоровления растений картофеля и снижают отрицательные эффекты друг друга [43].

1.2.4.4 Электротерапия картофеля in vitro

Помимо всех упомянутых выше методов, исследованиями также доказано использование электротерапии как простого метода, который использует электрический ток при взятии растительной ткани из любого материала инфицированного растения для снижения вирулентности за счет деградации нуклеопротеина вируса PVX, PVY, PVS, PVA и PLRV [38]. По сравнению с традиционной техникой термотерапии и культуры меристем, электротерапия является наиболее эффективной с точки зрения скорости элиминации вируса и срока регенерации проростков [51]. Но исследования показали, что вирусные структуры и генотипы растений реагируют на воздействие в зависимости от техники проведения манипуляций [52]. Те же данные далее показали, что сила электрического тока и продолжительность методики – факторы, существенно расширяющие возможности этой техники. Singh и Kaur [53] для контроля и предотвращения распространения вируса PLRV и вириоида PSTVd, использовали ростки, узловые сегменты и концы побегов для стандартизации методики. Ими было обнаружена высокая скорость регенерации проростков и эффективность искоренения вирусов, а также, что кончики побегов дают высокий процент свободных от вирусов проростков картофеля как для PLRV, так и PSTVd.

Все указанные выше методы оздоровления картофеля имеют один существенный недостаток – не предотвращают повторное заражение растений при выращивании в поле. Наиболее перспективным подходом в этом случае является получение генетически устойчивых к вирусным инфекциям сортов и гибридов. В связи с этим существует несколько подходов к получению вирусостойчивых сортов картофеля: классические методы селекции с последующим отбором и применение технологий генной инженерии. Последняя представляет собой наиболее перспективный подход к получению резистентных растений, поскольку имеет очевидные преимущества, такие как, специфичность к патогену, возможность получать устойчивые к вирусам растения на основе практически любого сорта и быстрота получения резистентных растений. Генная инженерия картофеля включает поиск генов устойчивости и их применение для защиты растений и применение подхода, основанного на природном механизме РНК-интерференции.

1.3 Гены растений, обеспечивающие устойчивость к вирусам

Гены R (резистентности) являются доминирующими генами растений, которые кодируют белки, участвующие в общем надзоре для идентификации конкретного патогена. Наличие несовместимой реакции в определенной комбинации гена R растения и вируса приводит к реакции гиперчувствительности (HR), когда клетки, окружающие первоначально инфицированную клетку, запрограммированы на гибель, что приводит к изоляции вирусных инфекций. Часто такие ответы у устойчивых растений запускают системную приобретенную устойчивость, которая сигнализирует о состоянии высокой устойчивости для дальнейшего заражения вирусом. Открытие гена устойчивости N у *Nicotiana glutinosa* и его последующее использование в программе селекции культивируемого табака (*N. tabacum*) практически исключили заболеваемость TMV. Ген N при экспрессии в виде трансгена придавал устойчивость восприимчивым генотипам *N. tabacum*, а также томатам (*Lycopersicon esculentum*) [54, 55].

Подобно гену N, продукт, кодируемый геном Rx, придает устойчивость к PVX картофелю и трансгенным растениям *Nicotiana benthamiana* и *N. tabacum* [56]. Продукт гена Rx, структурно сходный с другими продуктами гена R, ограничивает вирус независимым от HR образом. Однако, продукт гена обладает способностью вызывать гибель клеток. Несмотря на ассоциацию нескольких генов R, придающих устойчивость к вирусам, кроме генов N и Rx, Tm-22 является единственным другим геном R растений, который был клонирован и показал, что он придает устойчивость к вирусам [57].

В дополнение к генам R трансгенная устойчивость также была продемонстрирована путем экспрессии генов, которые придают устойчивость к системному перемещению растительных вирусов, но не с участием HR. Продукты генов RTM1 и RTM2 *Arabidopsis thaliana*, напоминают α -цепь жакалина, растительный лектин и небольшой растительный белок теплового шока соответственно [58, 59]. Эти два гена вместе ограничивают перемещение *Tobacco etch virus* у *A. thaliana* [59].

Потребность в цис- и транс-действующих протеазах, кодируемых вирусом, для процессинга вирусных белков предполагает, что ингибиторы протеаз можно использовать для контроля взаимодействия вирусов. Процессинг полипротеинов является общей чертой многих вирусов, но особенно вирусов семейств *Potyviridae* и *Comoviridae*. Цистатин риса, который ингибирует цистеиновые протеиназы, при экспрессии в табаке способен придавать устойчивость к PVY и *Tobacco etch virus* [60]. Трансгенные растения не были устойчивы к TMV, что указывает на то, что устойчивость была специфической для двух протестированных вирусов семейства *Potyviridae*. Однако полезность этих генов в трансгенной резистентности еще предстоит доказать.

1.4 РНК-интерференция (РНКи)

РНК-интерференция [61] (сайленсинг РНК, молчание РНК) – представляет собой механизм регуляции генов, который ограничивает уровень транскрипта либо путем подавления транскрипции (транскрипционное молчание генов, ТМГ), либо путем активации процесса деградации РНК, специфичного для последовательности (посттранскрипционное молчание генов (ПТМГ/интерференция РНК, РНКи) [62].

1.4.1 История открытия

Первые наблюдения за ПТМГ были зарегистрированы на растениях, но позже события, связанные с РНКи, были описаны почти во всех эукариотических организмах, включая простейших, мух, нематод, насекомых, паразитов, а также клеточные линии мыши и человека. Описаны три фенотипически различные, но механически сходные формы РНКи: косупрессия или ПТМГ у растений, подавление у грибов, и РНКи у животных. Было обнаружено, что образование микроРНК, гетерохроматизация и т. д. являются другими аспектами естественных процессов РНКи в эукариотических клетках.

Во время запуска механизма РНКи в качестве индукторов действуют молекулы двухцепочечной РНК (дцРНК), которые либо сначала расщепляют молекулы-индукторы на более мелкие фрагменты [63] и разрушают родственные клеточные или вирусные молекулы мРНК (называемые мишенями), [64] или действуют как активаторы этого процесса. В результате мРНК-мишени не могут накапливаться в цитозоле, хотя они остаются обнаруживаемыми с помощью анализов ядерного содержимого [65]. В некоторых случаях, ДНК, экспрессирующая мРНК-мишень, также подвергается метилированию как побочный продукт процесса деградации [66].

Естественными функциями РНКи и связанных с ней процессов являются защита генома от вторжения мобильных генетических элементов, таких как вирусы и транспозоны, а также организованное функционирование программ развития эукариотических организмов.

1.4.2 РНКи в растениях

У растений история с сайленсингом РНК развернулась во время поиска трансгенных цветков петунии, которые, как ожидалось, будут более

фиолетовыми. В 1990 г. лаборатория R. Jorgensen хотела повысить активность гена халконсинтазы (*chsA*), фермента, участвующего в производстве антоциановых пигментов. При этом, некоторые трансгенные растения петунии, несущие кодирующую область *chsA* под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты (Cauliflower Mosaic Virus, CaMV), потеряли как эндогенную, так и трансгенную активность халконсинтазы, и, таким образом, многие цветки стали пестрыми или образовали белые участки [67]. Потеря цитозольной мРНК *chsA* не была связана с уменьшением транскрипции, как показано в тестах на транскрипцию в изолированных ядрах [68]. Jorgensen ввел термин косупрессия для описания потери мРНК как эндо-, так и транс- генов.

Примерно в то же время две другие лаборатории [69, 70] также сообщили, что введение транскрипционных трансгенов может подавлять экспрессию гомологичных эндогенных генов. Впоследствии, в литературе сообщалось о многих подобных случаях косупрессии. Все случаи косупрессии приводили к деградации эндогенных и трансгенных РНК после ядерной транскрипции [71]. Поскольку посттранскрипционная деградация РНК наблюдалась в широком диапазоне трансгенов, экспрессирующих растительные, бактериальные или вирусные последовательности, ее переименовали в посттранскрипционное молчание генов (ПТМГ). ПТМГ может быть инициировано не только смысловыми трансгенами, но и антисмысловыми трансгенами. Биохимические данные свидетельствуют о том, что сходные механизмы могут действовать в обоих случаях [72]. Стоит отметить, что хотя феномен косупрессии изначально наблюдался у растений, он не ограничивается растениями, а также был продемонстрирован у многих животных, включая млекопитающих [73].

В разные периоды времени, наблюдаемые изменения фенотипов, вызываемых посредством ПТМГ, связывали с многосайтовыми интеграциями, образованием аберрантных мРНК, повторяющимися структурами трансгенов и т.д. Позже стало ясно, что экспрессия трансгена приводит к образованию дцРНК, что, в свою очередь, инициировало внутриклеточный процесс РНКи. Например, в случае косупрессированных растений петунии, мРНК *chsA* образовывала частичный дуплекс, т.к. существуют области самокомплементарности, расположенные между 3'-кодирующей областью *chsA* и ее 3'-нетранслируемой областью [74]. Это было выявлено с помощью анализа последовательности ДНК и экспериментального обнаружения *in vitro* транскрибируемого, устойчивого к РНКазе дуплекса *chsA* РНК.

Работами нескольких лабораторий было установлено, что почти полная потеря стационарного накопления мРНК-мишени происходит, если трансгенная конструкция в трансформированном растении продуцирует ядерный транскрипт в двухцепочечной (дц) конформации. Сообщалось, что экспрессия собственной РНК вируса оспы сливы под контролем промотора *rolC* вызывает деградацию трансгенной вирусной РНК, и в результате с высокой частотой возникает системная устойчивость к заболеванию инокулятом вируса оспы сливы трансгенного табака *Nicotiana benthamiana* [75]. Эти данные указывают на то, что продукция дцРНК необходима для инициации РНКи у растений. На основании этого в настоящее время получают растения, несущие сильно

транскрибирующиеся трансгены как в смысловой, так и в антисмысловой ориентации, которые демонстрируют сильные признаки РНКи. Эти трансгенные растения могут подавлять эндогены, инвазивные вирусные РНК или нежелательные чужеродные гены последовательно-специфическим и наследуемым образом. Как правило, смысловые и антисмысловые компоненты вышеупомянутых трансгенов разделены только интроном для повышения эффективности ПТМГ [75, 76].

Независимо друг от друга, исследования различных организмов, по-разному обозначаемых как ПТМГ у растений, РНКи у животных, подавление у грибов и вирус-индуцированное замалчивание генов, сошлись на универсальной парадигме регуляции генов. Важнейшими общими компонентами парадигмы являются то, что: 1) индуктором является дцРНК, 2) РНК-мишень деградирует зависимым от гомологии образом, и 3) механизм деградации требует набора белков, сходных по структуре и функциям у большинства организмов. В большинстве этих процессов наблюдаются определенные инвариантные черты, в том числе образование коротких интерферирующих РНК (киРНК) и специфическая для организма системное распространение сайленсинга от места его инициации [61].

1.4.3 Вирус-индуцированное замолкание генов

Помимо процессов, упомянутых выше, во время роста вирусных геномов в инфицированных растениях также происходит гомологичная деградация РНК [65]. Вирусы могут быть источником, целью или одновременно источником и целью подавления. РНКи, опосредованная вирусами, может встречаться у РНК-вирусов, которые реплицируются в цитоплазме, а также у ДНК-вирусов, которые реплицируются в ядре [77]. Еще в 1920-х годах было известно, что растения можно защитить от тяжелого вируса путем предварительного заражения легким штаммом близкородственного вируса. Хотя механизм такой перекрестной защиты у растений долгое время оставался неизвестным, такие явления можно было частично объяснить с точки зрения РНКи, которые могли быть индуцированы мягким штаммом и направлены позже против вирулентного вирусного генома. Также было обнаружено, что трансформация растений трансгенами, полученными из вируса, обеспечивала защиту от контрольных вирусов, даже если трансгенный белок не продуцировался [78].

Анализ этих вирусоустойчивых растений показал, что трансгены в высокой степени транскрибируются в ядре, тогда как стационарный уровень цитоплазматической мРНК был очень низким. Дальнейший анализ показал, что некоторые из трансгенных молекул мРНК принимают конформацию дцРНК, которая запускает специфичную для последовательности деградацию собственной и других гомологичных последовательностей или последовательностей копиРНК в цитоплазме. Таким образом, в вирусоустойчивых линиях деградировали не только трансгенные мРНК, но и мРНК гомологичного эндогенного гена, и вторгшаяся вирусная РНК (с гомологией к трансгену). Другой формой индуцированного вирусом молчания генов является самовосстановление вируса. Когда рапс *Brassica napus*

инокулировали CaMV (ДНК-вирусом), поражения в месте проникновения вируса были видны через 5-7 дней после инокуляции. Симптомы системных инфекций проявлялись через 10-14 дней после прививки. Симптомы были наиболее заметными через 30-40 дней после инокуляции и затем уменьшались (т.е. растения выздоравливали), а вновь появившиеся листья оставались бессимптомными через 50 дней после инокуляции [79].

1.4.4 Короткие интерферирующие РНК (киРНК)

Ключевое понимание процесса РНКи было получено из экспериментов Vaulcombe и Hamilton [80], которые идентифицировали продукт деградации РНК как вид малых РНК из ~ 21-25 нт как смысловой, так и антисмысловой полярности. киРНК формируются и накапливаются в виде дцРНК определенной химической структуры. Этот класс молекул РНК сначала был обнаружен в растениях, подвергшихся либо косупрессии, либо вирус-индуцированному молчанию генов, и не обнаруживался в контрольных растениях, которые не подвергались сайленсингу. киРНК впоследствии были обнаружены в клетках культуры тканей дрозофилы, в которых РНКи индуцировали путем введения экзогенной дцРНК длиной 500 нт [81], в экстрактах эмбрионов дрозофилы, в которых проводили РНКи *in vitro* [82], а также в эмбрионах дрозофилы, которым инъекцировали дцРНК [83]. Таким образом, оказалось, что генерация киРНК (от 21 до 25 нт) является сигналом любого гомологически зависимого события РНКи.

1.4.5 Амплификация и системное распространение РНКи

Помимо образования киРНК, другой интригующей характеристикой зависимого от гомологии молчания генов является то, что индукторные молекулы дцРНК не действуют стехиометрически. Было подсчитано, что только две молекулы дцРНК на клетку способны индуцировать РНКи эффективно экспрессируемого гена *Caenorhabditis elegans*, такого как *unc22*. В другом сообщении инъекция дцРНК в кишечник гермафродита *C. elegans* генерировала РНКи, которая может стабильно передаваться по наследству до поколения F2. Эти два открытия привели к предположению, что сигналы РНКи могут быть системными и амплифицируемыми по своей природе [84]. Подобные системные эффекты РНК-интерференции также были продемонстрированы у планарии *Schmidtea mediterranea* и гидарии *Hydra magnipapillata* [85].

Аналогичные данные также доступны для ПТМГ растений. Новые ткани, растущие из GUS-экспрессирующего привоя, привитого к GUS-экспрессивному подвою, демонстрируют постепенное подавление GUS-экспрессии [86]. Сигнал молчания, по-видимому, распространяется неметаболическим, ген-специфическим диффузным сигналом, который распространяется как между клетками через плазмодесмы, так и на большие расстояния через флоэму [87]. В случае индуцированного вирусом молчания генов также выявлен системный характер [46]. Для учета генной специфичности системного сигнала было высказано предположение, что сигнал может представлять собой молекулу РНК

[88]. Однако такие процессы не универсальны, так как не встречаются у насекомых и млекопитающих.

1.4.6. Общие пути РНК-интерференции (РНКи)

Пути молчания РНК (Рисунок 1.4, А) используют РНК длиной 20-30 нт [89], нагруженные на белки Argonaute, которые направляют специфичную для последовательности репрессию посредством спаривания оснований с РНК-мишенью. Пути молчания РНК различаются по происхождению и биогенезу малых РНК, механизмам, ведущим к репрессии мишеней, и биологическим ролям [90]. РНК-субстраты, дающие начало малым РНК-направляющим в путях РНКи, различаются по структуре. Они включают двухцепочечную РНК (дцРНК) с тупыми концами, малые и длинные шпильки РНК с полной и неполной комплементарностью, смысловую и антисмысловую РНК (с парой оснований или без) или одноцепочечную «аберрантную» РНК, которая может быть преобразована в дцРНК с помощью РНК-зависимых РНК-полимераз (RDR) или непосредственно превращаются в малые РНК. Субстраты могут быть преобразованы в малые РНК либо с помощью Dicer, РНКазы III, расщепляющей предшественников дцРНК и/или канонических микроРНК, либо с помощью какого-либо Dicer-независимого механизма [91].

Общие биологические роли путей РНКи включают регуляцию экспрессии эндогенных генов, противовирусный иммунитет и защиту генома от мобильных элементов [90]. В ходе эволюции сайленсинг РНК мог эволюционировать в сложную систему взаимосвязанных путей [92] или в относительно простую структуру (в соматических клетках млекопитающих).

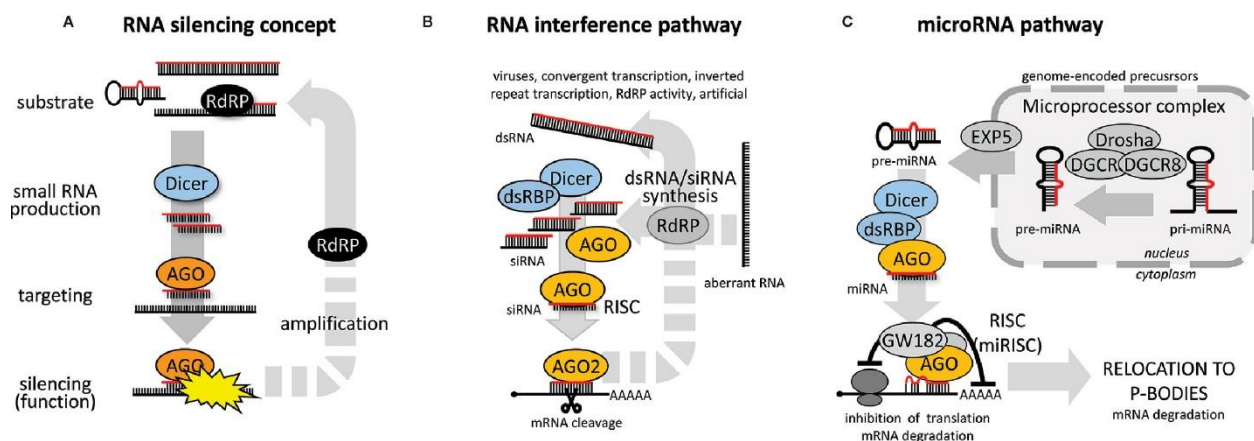


Рисунок 1.4 – Пути РНК интерференции. А – Общая концепция молчания РНК. В – Общий обзор пути РНКи. С – Путь миРНК (установлено на животных) [89].

1.4.7 Путь РНКи

Канонический путь РНКи (Рисунок 1.4, В) инициируется расщеплением длинной дцРНК на малые интерферирующие РНК (миРНК). Затем одна цепь миРНК загружается на белок Argonaute, обладающий эндонуклеазной активностью (например, AGO2 у позвоночных и членистоногих). Комплементарная мРНК расщепляется Argonaute в середине дуплекса миРНК:мРНК. В некоторых таксонах (например, у растений или *C. elegans*) пути

РНК-интерференции используют вышеупомянутые RDR, которые могут обеспечивать петлю амплификации, синтезирующую малые РНК или дцРНК на матрицах-мишенях РНК [93]. *C. elegans* использует так называемую «transitive RNAi», где RDR продуцирует вторичные миРНК, расположенные выше последовательности-мишени [94].

Каноническая РНКи традиционно рассматривается как защитный путь, обеспечивающий противовирусный врожденный иммунитет у беспозвоночных и растений против вирусов, продуцирующих дцРНК [95]. Однако РНК-интерференция может выполнять дополнительные функции, такие как поддержание целостности генома за счет подавления мобильных элементов или контроля экспрессии генов. В растениях, например, основной механизм РНКи был интегрирован в сложную систему путей посттранскрипционного и транскрипционного молчания, который использует несколько белков Dicer, Argonaute и RDR и функционирует в противовирусной защите, защите целостности генома и регуляции экспрессии генов [92, 96].

1.4.8 Компоненты пути РНКи

1.4.8.1 Dicer-подобные белки (DCL)

DCL представляют собой семейство эндорибонуклеаз РНКазы III, которые осуществляют стадию инициации механизма РНКи, при котором дцРНК расщепляются на малые РНК длиной 21-24 нт [97, 98]. DCL содержат домены DExD-box хеликазы-С, домен Piwi-Argonaute-Zwille (PAZ), домен неизвестной функции 283 (DUF283), РНКазы III и дцРНК-связывающие домены (dsRBD). Хеликазы представляют собой ферменты, вызывающие разделение двухцепочечных нуклеиновых кислот, использующие свободную энергию и гидролизующие нуклеотидтрифосфаты для вытеснения связанных белков [99]. Функциональный домен хеликазы DExD/H-box также необходим для эффективной продукции DCL-зависимой продукции малых РНК [100]. Домен PAZ имеет фосфат-связывающий карман, состоящий из аргининовых компонентов, которые распознают 5'-монофосфат пре-миРНК и необходим для расщепления дцРНК [101-103]. DUF283 действует как отжиг, который способствует гибридизации между комплементарными цепями нуклеиновых кислот [104]. Функция домена РНКазы III состоит в том, чтобы расщеплять дцРНК, оставляя выступающий конец из 2 нт на 3'-конце продукта [105, 106]. N- или C-концы dsRBD участвуют в регуляции ядерно-цитоплазматического распределения белка, а также обладают способностью связываться с дцРНК [107, 108]. Конкретная функция каждого домена варьируется в зависимости от белка Dicer. Белки Dicer консервативны во всем царстве растений, и на сегодняшний день различные белки DCL были идентифицированы у разных видов растений, которые подразделяются на четыре отдельные группы. Растительные DCL продуцируют миРНК разного размера: DCL1 продуцирует 21 и 22 нт миРНК из коротких несовершенных шпилек РНК, тогда как DCL2, DCL3 и DCL4 продуцируют 22 нт, 24 нт и 21 нт, соответственно, из длинных, идеально спаренных РНК [109]. DCL1 участвует в генерации и процессинге миРНК. Вирусные дцРНК, процессированные DCL2 и DCL3, необходимы для

модификации хроматина и также продуцируют гетерохроматиновые киРНК (hc-siRNA). DCL3 также является важным элементом путей РНК-направленного метилирования ДНК и процессирует генерируемые RDR2 дцРНК в киРНК [110]. DCL4 процессирует транс-действующие малые интерферирующие РНК (ta-siRNA) и может быть заменой для DCL1 и DCL2, когда они отсутствуют [111-113]. Продукт DCL или стадии инициации загружается в RISC для дальнейшей обработки.

1.4.8.2 Белки семейства Argonaute (AGO)

Белки AGO являются высокоспециализированными модулями связывания малых РНК и считаются важными компонентами RISC в путях сайленсинга [114]. Белки AGO выполняют эффекторную фазу молчания, а малые РНК, продуцируемые на стадии инициации, загружаются в белки AGO, чтобы направлять специфичную для последовательности регуляцию экспрессии генов. Структурный анализ показывает, что белки AGO содержат три консервативных домена, такие как домены PAZ, Middle (MID) и wimpy, индуцированные Р-элементом (PIWI). N-концевой домен состоит из N-концевого участка и домена PAZ, которые облегчают разделение малых РНК и закрепляют 3'-конец связанной малой РНК, соответственно. С-концевая доля содержит домены MID и PIWI, а также связывающий карман на стыке этих доменов, который закрепляет 5'-конец малых РНК [115], однако домен PIWI может функционировать подобно РНКазе H, которая расщепляет мРНК-мишень [116]. Растительные белки AGO подразделяются на четыре группы, и каждая группа выполняет определенную функцию. Наиболее важной функцией белков AGO является усиление защиты и иммунитета растений за счет расщепления загруженных малых РНК. Примечательно, что белкам AGO требуются белки теплового шока (Hsp70-Hsp90) для сопровождения и гидролиза АТФ для процесса загрузки и конформационных изменений [117, 118]. Размер и тип 5' нт помогают в сортировке миРНК на специфические белки AGO [114]. Менее стабильная молекула дц-миРНК со спариванием 5'-конца сохраняется внутри AGO, в то время как другие удаляются [119, 120]. Действие специализированных белков AGO и малых РНК делит пути РНКи растений на транскрипционное молчание генов (ТМГ) и посттранскрипционное молчание генов (ПТМГ). AGO4, 6 и 9 играют роль в ТМГ, тогда как AGO1, 2, 3, 5, 7 и 10 участвуют в ПТМГ [114].

1.4.8.3 Белки РНК-зависимой РНК-полимеразы (RDR)

Третья фаза путей РНКи представляет собой усиление молчания, выполняемое полимеразми RDR (от RNA-dependent RNA polymerase), которые превращают оцРНК в дцРНК, и эти дцРНК снова процессируются ферментами DCL, что приводит к новому циклу РНКи. RDR считаются первым идентифицированным компонентом путей биогенеза малых РНК растений и характеризуются уникальным каталитическим доменом RDR [121, 122]. RDR первоначально были идентифицированы как ферменты РНК-вирусов, которые участвовали в репликации вирусного генома [123]. RDR также играют роль в поддержании целостности генома, формировании РНК-матрицы, РНКи и защите

от экзогенных РНК или ДНК [124, 125]. Белки RDR эукариотических организмов делятся на три основных класса: RDR α , RDR β и RDR γ .

RDR α существует во всех трех царствах. У животных присутствует белок RDR β , но отсутствует RDR γ , тогда как RDR γ присутствует у растений. Грибы содержат полимеразы как RDR β , так и RDR γ [124]. У арабидопсиса белки RDR включают шесть классов RDR, среди которых RDR-1, -2, -6 и RDR-3, -4, -5 принадлежат кладам RDR α и RDR γ , соответственно. RDR1, RDR2 и RDR6 широко изучаются в царстве растений. RDR1 участвует в амплификации экзогенной нуклеиновой кислоты и защите от насекомых и патогенов [126-128]. Взаимодействие RDR2 с белком, содержащим домен Jumo η ji (JmjC, JMJ24), способствует молчанию хроматина на основе РНК у высших растений [129]. Однако, также сообщалось, что во время РНКи смысловых транскриптов RDR6 запускает метилирование ДНК транскрибируемой области, а RDR2 не требуется для этого типа метилирования [130, 131]. Функция RDR6-RDDM корректно установлена, поскольку она запускает метилирование мобильных элементов и эпигенетическое молчание [132]. RDR6 также участвует в начальном восприятии сигнала и контроле накопления miR165/166 во время нормального развития растений [133, 134]. RDR6 процессирует aberrantные несплайсированные пре-мРНК и направляет их на путь сайленсинга РНК [135].

На основании биогенеза, зависящего от RDR, миРНК делятся на две основные категории: поэтапные и связанные с повторами короткие интерферирующие РНК, известные как RDR1/2/6-зависимые малые РНК, в то время как миРНК и другие малые РНК, полученные из шпилек, являются RDR независимыми малыми РНК. Наиболее важная роль растительных белков RDR заключается в сотрудничестве с другими компонентами механизма РНК-интерференции и обеспечении защиты от вторжения нуклеиновых кислот. Белки DCL, AGO и RDR, идентифицированные у различных видов растений, перечислены в Таблице 1.1.

Таблица 1.1. – Количество Dicer-подобных белков (DCL), Argonaute (AGO) и РНК-зависимых РНК полимераз (RDR), идентифицированных у различных видов растений [97].

Вид растения	DCL	AGO	RDR	Источник
<i>Arabidopsis thaliana</i>	4	10	6	[136]
<i>Brassica napus</i>	13	28	16	[137, 138]
<i>Capsicum annuum</i>	4	12	6	[139]
<i>Coffea canephora</i>	9	11	8	[140]
<i>Cucumis sativus</i>	5	7	8	[141]
<i>Glycine max</i>	7	21	7	[142]
<i>Nicotiana benthamiana</i>	4	9	3	[143]
<i>Oryza sativa</i>	8	19	5	[144]
<i>Phaseolus vulgaris</i>	6	17		[145]

Продолжение Таблицы 1.1

<i>Salvia miltiorrhiza</i>	5	10	5	[146-148]
<i>Setaria italica</i>	8	19	11	[149]
<i>Solanum lycopersicum</i>	7	25	6	[150]
<i>Solanum tuberosum</i>	7	11	7	[151, 152]
<i>Sorghum bicolor</i>	5	14	7	[142]
<i>Vitis vinifera</i>	4	13	5	[153]
<i>Zea mays</i>	5	18	5	[154]

1.5 Механизм РНК-интерференции растений и взаимодействие с вирусами

1.5.1 Механизм подавления РНК растений против вирусов

Вирусам нужен вектор для передачи от одного хозяина к другому, и они используют ресурсы хозяина для своего размножения и распространения. В отличие от других патогенов, вирусы размножаются внутри клеток-хозяев, поэтому пути РНКи играют решающую роль в противовирусной защите. У растений первичными мишенями механизма РНКи являются вирусы с РНК-геномами, которые продуцируют промежуточные соединения дцРНК в процессе репродукции. DCL2 и DCL4 непосредственно процессируют вирусные РНК и продуцируют короткие интерферирующие РНК (киРНК) длиной 22 и 21 нт, которые далее загружаются в комплексы AGO1 и AGO2 для расщепления [155]. В случае ДНК-вирусов фаза дцРНК отсутствует в их цикле репликации, а для РНКи необходимы RDR6 и Suppressor of gene silencing 3 (SGS3) [156]. ДНК-вирусы также требуют, чтобы все четыре белка DCL продуцировали киРНК размером 21, 22 и 24 нт в клетках-хозяевах [157]. Размножение вируса увеличивает накопление киРНК вирусного происхождения во время инфекции, и многие исследования показали, что инокуляция вирусом индуцирует уровень транскрипции различных генов РНКи у разных видов растений.

киРНК, продуцируемые DCL, включаются в AGO, что является важным шагом для подавления внешней нуклеиновой кислоты. У растений были идентифицированы различные AGO и выявлены функции нескольких представителей против множества вирусов. Генетический анализ белков AGO арабидопсиса показал, что только AGO1, 2 и 7 вовлечены в устойчивость к вирусу и играют роль в подавлении РНК и рестрикции вируса [158, 159]. Среди них AGO1 рассматривается как первый уровень активации, а AGO2 – как второй уровень защиты для ограничения накопления вируса после подавления AGO1 вирусным супрессором. Активация второй защиты также указывает на потерю первого слоя из-за подавления AGO2 с помощью AGO1 через miR403 [160]. Точно так же AGO5 играет противовирусную роль в отсутствие AGO2. Однако оба обладают способностью связывать вирус-индуцированные киРНК (vsiРНК). Двойные мутанты арабидопсиса ago2 ago5 более восприимчивы к вирусу, чем одиночные мутанты [161, 162]. AGO1 обладает способностью нацеливаться на

вирусные РНК с компактной структурой, в то время как AGO7 предпочитает менее структурированные РНК и оба участвуют в молчании РНК вируса морщинистости турнепса (TCV) [163]. Мутанты ago1, ago2 и ago7 (knockdown) проявляют повышенную гиперчувствительность к CMV, TCV, TMV, вирусу X картофеля (PVX) и вирусу кольцевой пятнистости [158, 163-167].

Сходным образом, растениям требуются белки AGO (AGO4, AGO6, AGO9) для системного молчания, где AGO4 играет решающую роль в поддержании или активации экспрессии чувствительных к стрессу генов посредством модификации хроматина или предотвращения криптической транскрипции [168, 169].

Белки RDR хозяина используют вирусные первичные молекулы киРНК в качестве праймера и превращают их в длинные дцРНК, что приводит к усилению сигналов РНКи. RDR1, RDR2 и RDR6 считаются важными членами, которые участвуют в различных биологических процессах молчания РНК. Функция различных компонентов пути РНК-интерференции растений против РНК-вирусов и подавление с помощью супрессоров сайленсинга представлены на Рисунке 1.5.

1.5.2 Антивирусная роль РНК-интерференции. Биогенез вирус-индуцированных киРНК (*vsіРНК*)

Как один из первых открытых типов миРНК, существование вирус-индуцированных киРНК (*vsіРНК*) дало первый намек на то, что сайленсинг может играть противовирусную роль [80]. Биогенез *vsіРНК* требует ферментов DCL. Молекулы вирусного субстрата для DCL различаются в зависимости от стратегии репликации вируса. В случае РНК-вирусов высокоструктурированные области вирусной одноцепочечной РНК (оцРНК) и репликативных интермедиатов (RI) могут быть основным источником продукции *vsіРНК* [170-172]. В случае ДНК-вирусов перекрывающиеся конвергентные/двунаправленные считываемые транскрипты или обратная структура определенных областей РНК-транскриптов способствуют биогенезу *vsіРНК* [157, 173] (Рисунок 1.5). Генетические исследования и анализ глубокого секвенирования *vsіРНК* с участием мутантов *dcl Arabidopsis* показали, что между DCL существует строгая иерархия в отношении их вклада в продукцию *vsіРНК*. Основным DCL при РНК-вирусных инфекциях является DCL4, тогда как DCL2 становится критическим при его отсутствии (у мутанта *dcl4*) [174]. Сообщалось о дополнительном функциональном разнообразии между DCL4 и DCL2: DCL2 стимулирует транзитивность и вторичную продукцию киРНК, в то время как DCL4 достаточен для сайленсинга [175]. DCL3 играет лишь незначительную роль в борьбе с РНК-содержащими вирусами [163, 176]. Тот факт, что подавляющие супрессоры РНК-вирусов мешают пути DCL3, предполагает, что DCL3 способствует подавлению противовирусного действия [177-179]. Во время антивирусного молчания против ДНК-вирусов DCL3 необходим и работает, предположительно, индуцируя модификации хроматина [157, 176]. DCL1 может действовать как негативный регулятор, ограничивающий DCL4 и DCL3 посредством пути миРНК [163, 177].

RNA Virus
Structure and Aberrant RNAs (Viral dsRNAs sources)

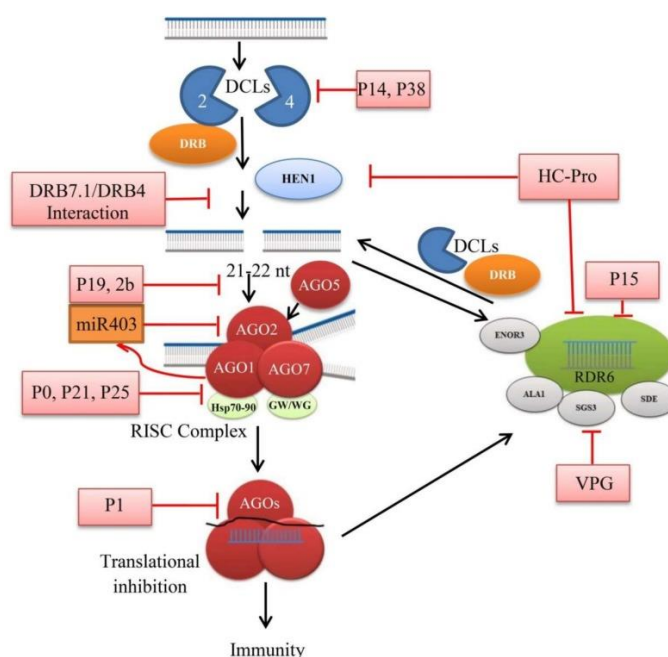


Рисунок 1.5 – Схематическая диаграмма РНК интерференции у растений против РНК-вирусов. DCL генерируют киРНК длиной 21–22 нт из вирусной дцРНК. киРНК включают в состав AGO, содержащих RISC, для молчания или ингибирования трансляции. Продукт RISC может поступать в линию амплификации и продуцировать вторичные киРНК посредством действия РНК-зависимых RDR и кофакторов. Вирусные белки-супрессоры могут блокировать механизм РНКи, ингибируя функцию различных компонентов (розовая рамка). Подавление AGO2 с помощью AGO1 через миРНК (оранжевая рамка) [97].

Кофакторы DCL, белки DRB, также необходимы для биогенеза vsiРНК. DRB4, кофактор DCL4, принимает участие в противовирусной защите от РНК-содержащих вирусов [180]. Наблюдение, что супрессор сайленсинга Р6 вируса мозаики цветной капусты (CaMV) ингибирует DRB4, убедительно свидетельствует о том, что DRB4 также является противовирусным фактором против ДНК-вирусов. DRB3, кофактор DCL3, способствует противовирусной защите путем модификации хроматина против ДНК-вирусов [176].

Опосредованное HEN1 метилирование vsiРНК имеет решающее значение для эффективной противовирусной защиты [181]. Мутанты *hen1* более восприимчивы к инфекциям вируса мозаики огурца (CMV) и вируса морщинистости репы (TCV) [182, 183].

1.5.3 Эффекторный этап антивирусного молчания

Нарезка сама по себе недостаточна для эффективного противовирусного подавления ответа [155], что позволяет предположить, что субстраты DCL могут быть только побочными продуктами процесса репликации вируса. vsiРНК-

связывающие VSR не нарушают нарезку, но эффективно ингибируют антивирусное замалчивание [184]. Следовательно, последующая AGO-зависимая эффекторная стадия необходима для ограничения репликации вируса и распространения как РНК-, так и ДНК-вирусов [177]. Свойства vsiРНК, такие как 5'-нуклеотид, длина, термодинамические свойства концов дуплекса, и структура дуплекса киРНК, определяют загрузку и сортировку в эффекторы AGO [185, 186]. В процессе РНК-вирусных инфекций AGO1 и AGO2 являются наиболее важными эффекторами, в то время как AGO5, 7, 10 могут играть дополнительные роли или действовать во время определенных комбинаций вирус-хозяин (см. Рисунок 1.5).

AGO, нагруженные vsiРНК, способны образовывать высокомолекулярные комплексы. Знания о кофакторах RISC (включая противовирусные RISC, vsiRISC), которые взаимодействуют с AGO в растениях, очень ограничены [187]. Было обнаружено, что белки теплового шока 70 и 90 (HSP70, HSP90) играют важную роль в загрузке AGO при использовании бесклеточной системы *in vitro*, которая повторяет процесс загрузки [188]. Дальнейшему пониманию компонентов, сборки и функций RISC могут помочь *in vitro* и переходные сенсорные системы [189].

1.5.4 Усиление молчания

Для достижения устойчивого ответа на сайленсинг фрагменты расщепления RISC иногда направляются обратно в механизм РНК-интерференции с помощью RDR-опосредованного синтеза дцРНК [96, 190]. После эндонуклеолитического расщепления AGO фрагменты одноцепочечных РНК, лишенные истинных признаков, таких как кэп-структура или полиА-хвост, распознаются RDR-полимеразами с помощью или без помощи первичной vsiРНК и превращаются в длинные дцРНК, которые являются субстратами DCL [191] (см. Рисунок 1.5). Было обнаружено, что RDR1, RDR2 и RDR6 (SDE1/SGS2) являются важными факторами продукции vsiРНК во время инфекций PVX, CMV, TMV, вируса мозаики сахарного тростника (SCMV), TuMV, вируса табачной погрешности (TRV). Синтезированные RDR дцРНК процессируются с помощью DCL4 и DCL2 в vsiРНК длиной 21-22 нт соответственно. vsiРНК длиной 21 и 22 нт были эффективны в противовирусном ответе против ряда вирусов, таких как CMV, вирус мозаики масличного рапса (ORMV), TCV, TRV, вирус курчавости листьев капусты (CaLCuV), CaMV [192, 193]. vsiРНК длиной 22 нт вносят вклад во вторичную продукцию киРНК и опосредуют системный сайленсинг [155, 194]. В случае сильно реплицирующихся РНК-вирусов участие RDR, по-видимому, менее важно. При заражении томбусвирусом большая часть vsiРНК происходит из положительной цепи РНК вирусного генома, что позволяет предположить, что они являются первичными продуктами расщепления DCL структур вирусной РНК. Сходным, независимым от RDR способом, огромное количество vsiРНК, происходящих от шпилек, продуцируется из 35S-лидера CaMV. Большинство вирусных киРНК, накапливающихся во время CaLCuV геминивиральной инфекции, представляли собой RDR1/2/6-независимые первичные киРНК, генерируемые путем

спаривания двунаправленных считываемых транскриптов кольцевого вирусного генома [173].

1.6 Стратегии подавления РНК-интерференции вирусами (супрессия)

Наиболее распространенной стратегией вирусов для защиты от подавления вирусной РНК является экспрессия белков, которые действуют как супрессоры РНКи (VSR). Открытие VSR убедительно подтвердило, что сайленсинг РНК является противовирусным механизмом. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что большинство вирусов кодируют по крайней мере один VSR, который в большинстве случаев необходим для успешного заражения вирусом. Подавление РНКи с помощью VSR также было описано у вирусов, поражающих насекомых и грибки [194]. Разнообразие VSR по последовательности и структуре указывает на то, что они развивались независимо. Было показано, что VSR блокируют практически все этапы молчания РНК, такие как инициация молчания, эффекторная фаза, фаза амплификации, модификация хроматина во время ТМГ или модуляция продуктов генов-хозяев для более благоприятной инфекции (Рисунок 1.6).

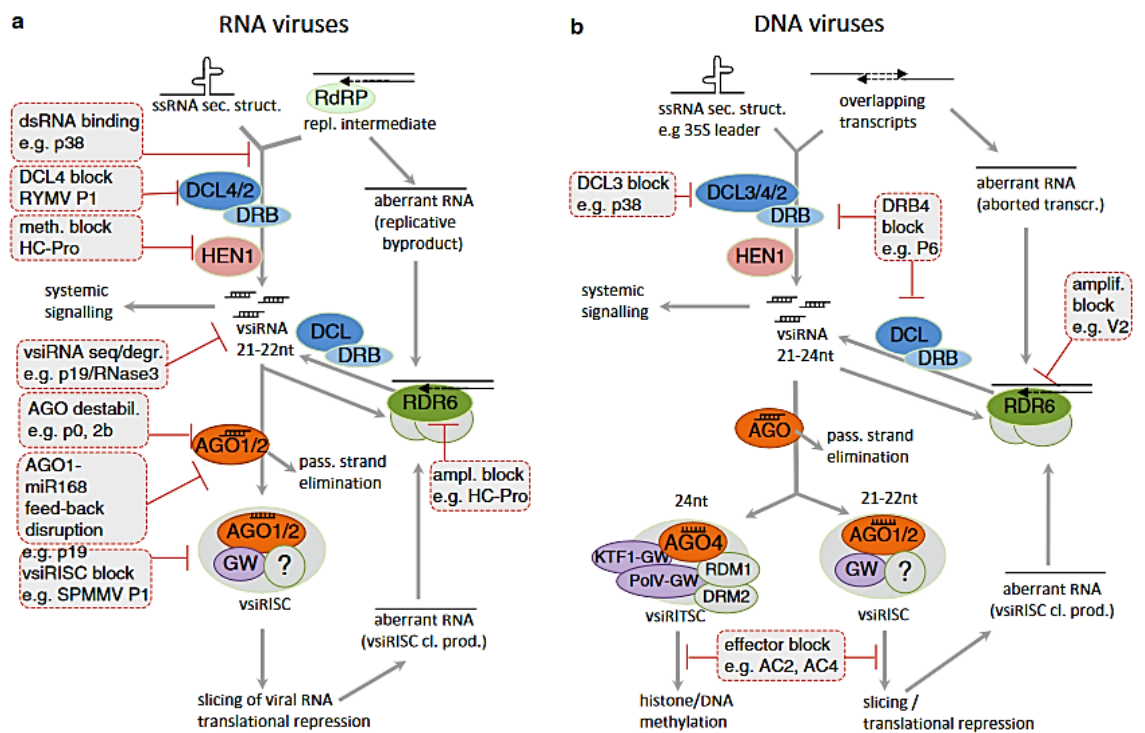


Рисунок 1.6 – Биохимическая схема сайленсинга антивирусной РНК и ее подавления с помощью вирусных белков супрессоров РНК-интерференции. Сайленсинг антивирусной РНК инициируется распознаванием вирусных структур дцРНК (репликативные промежуточные, частично двухцепочечные структуры с обратной складкой или пары перекрывающихся РНК-транскриптов), которые процессируются в вирусные ксРНК (vsiРНК) ДИСЕР-подобными белками (DCL). Впоследствии vsiРНК длиной 21-22 нт или 24 нт включаются в эффекторные комплексы, РНК-индуцированный комплекс

сайленсинга (RISC) или РНК-индуцированный транскрипционный комплекс сайленсинга (RITSC) соответственно. Знак вопроса представляет неизвестные кофакторы. vsiRISC нацеливается на вирусные РНК путем разрезания или ингибирования трансляции (а), в то время как RITSC индуцирует модификацию генома (б). Продукты расщепления и vsiРНК могут входить в петлю амплификации под действием РНК-зависимых РНК-полимераз (RDR) и кофакторов (SGS3 и SDE5) с образованием вторичных vsiРНК. Путь антивирусного молчания может быть остановлен в различных точках вирусными супрессорами РНК-интерференции (VSR) (а и б) (пунктирные прямоугольники) [61].

1.6.1 Вирусные супрессоры блокируют молчание растительной РНК

Чтобы нейтрализовать действие РНКи, хорошо адаптированные вирусы растений обладают белками-супрессорами РНК-интерференции, которые в значительной степени ослабляют защиту растений от такого типа вирусов [195]. Предполагается, что супрессоры необходимы для успешной вирусной инфекции, и большинство вирусов содержат по крайней мере один белок, который блокирует молчание РНК на любом этапе. При CMV-инфекции накопление различных вирусных киРНК, продуцируемых DCL1, DCL2 и DCL3, снижается за счет экспрессии 2b-супрессора [196]. Сходным образом, Р6 вируса мозаики цветной капусты (CaMV) взаимодействует с DRB4, важным партнером DCL4, и влияет на процессинг вирусных киРНК [197]. При инфекции, вызванной вирусом морщинистости турнепса, Р38 подавляет DCL, но его основной мишенью является DCL4, поскольку DCL4 производит сигнал подавления, чтобы ограничить выход вируса из сосудистого русла, Р38 ингибирует эту передачу сигналов [199]. Супрессоры CMV 2b и TRV 16K ограничивают начальное образование миРНК- и киРНК-управляемых RISC и связываются с AGO4 для предотвращения расщепления РНК-мишени, ингибируют активность слайсера AGO4 и метилирование многочисленных локусов [178, 199]. Более того, белки 2b и P0 ингибируют активность RISC посредством взаимодействия с PAZ-доменом белков AGO и направляя его деградацию [200-202]. Широкое распространение P0 в клетках-хозяина захватывает механизм, содержащий комплекс F-box или SKP1-CUL1-F-box (SCF), чтобы остановить РНКи путем дестабилизации AGO и приводит к тяжелым инфекционным заболеваниям [203]. В SPMMV супрессор P1 блокирует связывание РНК-мишени с AGO1, а домен цинковых пальцев P1 выполняет супрессорную функцию [204]. Белок оболочки вируса разрыва цветка пеларгонии (PFBV-CP) и супрессор P19 вируса кустистости томатов (TBSV) также предотвращают включение вирусных киРНК в комплекс RISC [205-207], однако P19 специфически ухудшает загрузку в AGO1, но не AGO2 [208] и мутант TBSV P19 очень восприимчивы к сайленсингу РНК [209, 210]. Вирус *Citrus tristeza* (CTV) P20 и P23 подавляют салициловую кислоту и защитные пути РНК-сайленсинга растений апельсина [211, 212]. Существование большего количества белков-супрессоров в одном вирусе, по-видимому, ведет к нацеливанию на различные пути защиты хозяина на

клеточном уровне для более успешного заражения. Белок оболочки и Р6 вируса легкой мозаики оливы (ОММV) проявляют супрессорную активность комплементарным образом, а подавление обоих супрессоров приводит к значительному снижению накопления вируса и симптомов по сравнению с одиночным подавлением [213].

Помимо подавления механизма РНК-интерференции хозяина, некоторые супрессоры участвуют в репликации и перемещении вируса, и для успешной инфекции им необходим фактор хозяина. Цистеин-богатый белок (CRP), 6К1 и 29К являются важными элементами, которые способствуют подавлению сайленсинга РНК в контексте репликации вируса на ранней стадии инфекции, тогда как белок 1 тройного блока генов (Triple Gene Box Protein TGBp1), HC-Pro, P3 и P3N-PIPO необходимы для перемещения вируса от клетки к клетке и на большие расстояния [214, 215].

1.6.2 Секвестрация вирус-индуцированных киРНК (*vsіРНК*)

Секвестрация дц-киРНК является широко распространенной стратегией, используемой несколькими VSR, происходящими из разных родов (P19, HC-Pro, P21, p15, p122/p126/p130, γB, NS3, NS, Pns10 и т. д.). Среди них, вероятно, наиболее известен белок томбусвирусов P19 [216]. Кристаллографические исследования показали, что гомодимер P19 действует как молекулярный калибр для секвестрации дуплексов миРНК в зависимости от размера. Секвестрация миРНК предотвращает сборку RISC, как показано *in vitro* системой извлечения гетерологичных эмбрионов *Drosophila* [217]. Похоже, что P19-опосредованная секвестрация *vsіРНК* избирательно влияет на загрузку AGO1, но не AGO2 у *N. benthamiana* во время вирусной инфекции CymRSV. Было показано, что из-за структурного сходства между *vsіРНК* и эндогенными миРНК, P19 предотвращает RISC-загрузку эндогенных видов миРНК в трансгенных растениях *A. thaliana* и *N. benthamiana*. Однако во время аутентичных вирусных инфекций P19-секвестрация эндогенных киРНК неэффективна [218]. *vsіРНК* томбусвируса более эффективно связываются с P19, чтобы превзойти эндогенные миРНК. Основой конкуренции *vsіРНК*, помимо их огромного количества, может быть структурное предпочтение P19 для совершенных форм дц-*vsіРНК* (в отличие от эндогенных миРНК, содержащих несоответствие).

1.6.3 Подавление усиления антивирусного молчания

Блокирование активности RDR с помощью VSR является очень эффективной стратегией, используемой вирусами, поскольку она ослабляет клеточно-автономную амплификацию молчания и системное перемещение сигналов в отдаленных тканях, чтобы облегчить репликацию и распространение вируса. Супрессор V2 TYLCV ингибирует опосредованную RDR6 амплификацию посредством прямого взаимодействия с SGS3, кофактором RDR6 [219]. Альтернативно, V2 может конкурировать с SGS3 за дцРНК, имеющую 5'-выступающий конец, который может быть субстратом/промежуточным звеном RDR6/SGS3 во время амплификации. Точно так же было показано, что TGBp1, кодируемый PVX, ингибирует RDR6/SGS3-зависимый синтез дцРНК [220].

Супрессор β C1 сателлитной ДНК TYLCCNV взаимодействует с эндогенным супрессором сайленсинга кальмодулин-подобного белка (rgsCAM) в *N. benthamiana* для подавления экспрессии RDR6 [221]. Было показано, что кодируемые SCMV HC-Pro, TAV 2b и Pns10 RDV подавляют RDR6, ограничивая амплификацию и замедляя системное молчание [222].

1.7 Стратегии трансгенной резистентности

Наблюдение за перекрестной защитой [223], когда инокуляция растения легкими штаммами вируса обеспечивает защиту от более тяжелых штаммов, предполагает, что возможны альтернативные подходы. Было предложено несколько гипотез для объяснения устойчивости, полученной путем перекрестной защиты, но методы их проверки не представлялись возможными в течение многих лет. Развитие методов генетических манипуляций высших растений с помощью бинарных векторов, полученных из *Agrobacterium tumefaciens*, позволило проверить несколько гипотез, связанных с перекрестной защитой. В одном из таких исследований экспрессия белка оболочки TMV в растениях *Nicotiana tabacum* задерживает появление симптомов у трансгенных растений при последующем заражении TMV [224] и приводит к многочисленным исследованиям, направленным на изучение перекрестной защиты, а также на создание устойчивых к вирусам культур, представляющих ценность для сельского хозяйства.

1.7.1 Вмешательство гетерологичных вирусных генов

Несколько вирусов растений кодируют специализированные белки, известные как белки межклеточного движения (movement proteins, MP). Эти белки либо взаимодействуют со вторичными плазмодесмами (межклеточными связями между соседними растительными клетками), либо образуют каналы, обеспечивающие межклеточный перенос вирионов и/или рибонуклеопротеиновых комплексов, содержащих вирусную РНК и один или несколько белков, кодируемых вирусом. Кроме того, MP также связываются с РНК и/или ДНК. Поскольку РНК-/ДНК-связывающий домен и домен, модифицирующий плазмодесмы, различаются, считалось, что мутанты по MP связываются с плазмодесмами и препятствуют опосредованному MP дикого типа плазмодесматному распространению вирусной РНК/ДНК. Ощутимым преимуществом этой стратегии является устойчивость широкого спектра растений к различным растительным вирусам, которые зависят от одного и того же типа плазмодесмы для установления инфекции. Экспрессия дефектных MP TMV с молекулярной массой 30 кДа, в дополнение к приданию устойчивости к TMV, также была способна придавать устойчивость к *Tobacco rattle virus*, вирусу кольцевой пятнистости табака (семейство *Comoviridae*), вирусу мозаики люцерны (семейство *Bromoviridae*), вирусу хлоротической полосатости арахиса (семейство *Caulimoviridae*) и CMV [225]. Среди протестированных вирусов представители *Comoviridae* и *Caulimoviridae* вместо использования белка, модифицирующего плазмодесмы, кодируют специализированный белок, образующий каналы, обеспечивающий перемещение вирионов из

инфицированных клеток в соседние. Укороченные МР ДНК-вирусов рода *Begomovirus* (семейство *Geminiviridae*), поражающих растения, также приводят к приданию устойчивости как к гомологичным, так и к гетерологичным вирусам [226, 227]. Однако неизвестно, как эти растения ведут себя в полевых условиях. Кроме того, поскольку растения развили плазмодесмы в качестве канала межклеточной коммуникации, вмешательство МР может повлиять на коммуникацию растений, что приведет к нежелательным трансгенным эффектам.

1.7.2 Посттранскрипционное молчание генов

ПТМГ или РНКи, являются недавно признанной стратегией создания устойчивых к вирусам растений. Двухцепочечная РНК, полученная из реплицирующегося вируса, трансгена или аберрантной РНК, может действовать как ключевая молекула-инициатор, которая впоследствии процессируется ферментом, подобным РНКазе III, с образованием РНК из 25 нт, известных как малые антисмысловые РНК [80], которые были впоследствии признаны малыми интерферирующими РНК (миРНК). РНК-индуцированный комплекс замалчивания (RISC), ключевым компонентом которого является эндонуклеаза, затем направляет миРНК для специфического расщепления гомологичных РНК [228]. Участие РНКи в защите от вирусов впервые было выявлено в трансгенных растениях с использованием потивирусной последовательности кДНК СР [78, 229]. Lindbo с соавт. [230] впервые предложили РНКи в качестве противовирусного механизма у растений. Это лучше всего достигается, когда растения трансформируют конструкциями, которые экспрессируют самокомплементарную РНК, содержащую последовательности, гомологичные вирусу-мишени растения. Трансгенные конструкции, кодирующие сплайсированную интроном РНК со структурой шпильки, обеспечивали стабильное подавление активности почти со 100% эффективностью против гомологичных вирусов растений [76]. Конструкции шпилек могут быть созданы с использованием смысловых/антисмысловых последовательностей длиной от 98 до 853 нт в конструкциях шпилек, способные эффективно подавлять от 90 до 100% вирусных заболеваний в независимости от трансгенных растений. В дополнение к экспрессии трансгена, транзientная экспрессия двухцепочечных РНК, соответствующая вирусным последовательностям, либо путем механической инокуляции, либо путем инфильтрации листьев, опосредованной *Agrobacterium*, также может придавать устойчивость к растительным вирусам [231].

1.7.3 Резистентность, опосредованная белками оболочки

Прошло четыре десятилетия с тех пор, как было описано первое сообщение об устойчивости, опосредованной белком оболочки (coat protein, СР), к ТМV у *N. tabacum* [224], за которым сразу же последовали сообщения об опосредованной СР устойчивости ко многим другим растительным вирусам [232, 233]. В большинстве случаев получение резистентности казалось главной целью, а исследований, направленных на понимание механизма (механизмов)

резистентности, довольно мало. Как минимум для TMV, модельного вируса для понимания взаимодействий между растениями и вирусами в прошлом столетии, были описаны механизмы, посредством которых интерферирует экспрессируемый трансгеном CP. Неспособность антисмысловой РНК [234] или нетранслируемой +смысловой РНК последовательности CP [235] запускать процесс убедительно доказывает, что экспрессия белка является фактором, придающим устойчивость. Широко распространено мнение, что разборка вириона, опосредованная полисомами, является первым шагом в установлении инфекции TMV. Исследования с использованием РНК TMV и вирусных частиц на протопластах, полученных из растений, экспрессирующих CP TMV, показали, что устойчивость была в первую очередь к вирусным частицам из-за вероятного вмешательства в начальные события во время инфекционного процесса [236]. Последующие исследования с использованием инкапсулированной *in vitro* геномной РНК TMV, содержащей репортерные гены, также показали, что разборка вириона была в основном снижена в трансгенных растениях. Однако устойчивость была ограничена инокулированной клеткой без явного влияния на распространение от клетки к клетке.

Экспрессия CP, по-видимому, необходима для успешной трансгенной резистентности к TMV, но сообщения о других вирусах, в которых нетранслируемая цистронная РНК CP придавала устойчивость трансгенным растениям [229, 237], предполагали, что экспрессия белка не всегда была абсолютным требованием для эффективной устойчивости. Тем не менее, первоначальные успехи в области устойчивости, опосредованной CP, привели к созданию растений, экспрессирующих различные последовательности CP вирусов и устойчивых к широкому спектру РНК-содержащих вирусов. Однако устойчивость, опосредованная CP, по-видимому, не работает для ДНК-вирусов, заражающих растения. Тем не менее, успех CP-опосредованной защиты привел к коммерциализации и появлению линий тыквы, устойчивых к вирусу мозаики огурца, вирусу желтой мозаики цуккини и вирусу мозаики арбуза [238], а также к трансгенной папайе, устойчивой к вирусу кольцевой пятнистости папайи [239].

1.7.4 Антисмысловая и смысловая РНК

Конструкции антисмысловой РНК, по существу, представляют собой комплементарные последовательности кДНК, стоящие под контролем промотора, чтобы экспрессироваться как РНК, комплементарные геномной РНК вируса. В дополнение к различным генам, геномы вирусов растений содержат последовательности нетранслируемой области (UTR), необходимые для инициации трансляции и амплификации генома. Хотя антисмысловые подходы были не очень эффективны, когда они были направлены на область CP TMV, включение 3'-UTR геномной РНК TMV RdRP оказалось эффективным [234]). Следует отметить, что вирусная RdRP связывается с 3'-UTR геномной РНК для инициации синтеза минус-смысловой РНК, которая затем копируется в геномную РНК. Любая задержка в синтезе РНК в конечном итоге привела бы к снижению титра вируса в данный момент времени и препятствовала бы системному распространению вируса. В дополнение к генам CP, несколько

неструктурных генов вируса, экспрессируемых либо в виде транслируемых, либо нетранслируемых транскриптов, часто придавали устойчивость к вирусам трансгенным растениям. Одним из лучших примеров такого подхода является экспрессия гена TMV 54 кДа, соответствующего карбоксильному концу репликазы 183 кДа [240]. Трансгенные растения, экспрессирующие этот ген, независимо от числа копий проявляли высокий уровень устойчивости к TMV. Однако белковый продукт, соответствующий этому гену, обнаружить не удалось, и растения не были устойчивы к отдаленно родственному штамму TMV. Установлено, что у этих растений РНК TMV могла ограничиваться инокулированными клетками [241]. Однако было обнаружено, что эти растения также проявляли ПТМГ, и замалчивание было специфично для антисмысловой цепи, но не для +смысловой цепи [242].

Изучение и выявление белков-супрессоров РНКи PVS, а также создание и использование для прикладных целей рекомбинантных ДНК, содержащих кодирующие последовательности вирусных белков и вызывающих искусственную индукцию РНКи, позволяют получить новые знания по следующим направлениям:

- приобретение фундаментальных знаний о физиологических, биохимических и молекулярно-биологических особенностях жизнедеятельности PVS и его отдельных штаммов (приоритет Казахстана в установлении белков PVS, которые являются супрессорами РНКи);
- приобретение фундаментальных знаний о взаимоотношениях между вирусом и растением-хозяином;
- приобретение фундаментальных знаний о взаимоотношениях растительных вирусов различных семейств при инфекции одного и того же растения;
- приобретение фундаментальных знаний о механизме супрессии РНКи при инфекции растения PVS и механизмах адаптации растения к условиям биотического стресса;
- совершенствование биотехнологии получения растений картофеля с генетически закрепленной устойчивостью к PVS и к другим фитопатогенным вирусам;
- совершенствование методов диагностики вирусных болезней картофеля.

Таким образом, идентификация вирусных белков-супрессоров клеточного процесса РНКи является важнейшим этапом для понимания молекулярных механизмов взаимоотношения вируса и клетки-хозяина и механизма адаптации растений к вирусным заболеваниям.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы исследований

Материалом исследований для мониторинга вирусных инфекций картофеля в двух регионах Республики Казахстан (Алматинская и Костанайская области) служили листья и клубни сортов казахстанской и зарубежной селекции, полученные из полевых коллекций Костанайского научно-исследовательского института сельского хозяйства (138 образцов) и Казахского научно-исследовательского института картофелеводства и овощеводства (119 образцов). Отбор образцов для анализа осуществлялся случайным образом.

Полные нуклеотидные последовательности трех изолятов PVS «Yunnan YN» (KC430335, Китай), «Vltava» (AJ863510, Чехия), «RL5» (JX683388, Колумбия), изолята PVM (D14449.2, Россия) и изолята PVX (M72416.1, Россия) были получены из открытой базы данных National Center for Biotechnology Information (NCBI GenBank, [243]).

Клубни картофеля, использованного для стабильной генетической трансформации были получены из Казахского научно-исследовательского института картофелеводства и овощеводства (КазНИИКО).

2.2 Методы исследований

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Для проведения ИФА (DAS-ELISA, Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) были использованы наборы фирмы «BIOREBA» (Швейцария) согласно инструкции. Поглощение при двух длинах волн 405 и 492 нм в образцах на плашке замерялось на иммуноферментном анализаторе EL311 («BIO-TECH Instruments», США). Положительным ответом на присутствие вируса считалось показание поглощения выше, чем в отрицательном образце с разницей 0,1 и выше после инкубации с субстратом в течение 1 ч при комнатной температуре. Анализ для каждого образца проводился трижды.

Выделение препаратов тотальных РНК

Из 0,5-1,0 г листьев отдельных растений, принадлежащих разным сортам и показавшим положительный ответ на ИФА, были выделены препараты тотальных РНК с использованием TRI-REAGENT («Sigma», США) согласно стандартному протоколу. Осадок растворяли в 100 мкл стерильной деионизированной воды. Качество выделенных препаратов тотальных РНК оценивалось электрофорезом в 1,2% агарозном геле. Количество выделенных РНК в препаратах замерялось на спектрофотометре Ultrospec 2000 («Pharmacia Biotech», Великобритания) [244].

Реакция обратной транскрипции (РОТ) и мультиплексной ПЦР (РОТ-мпПЦР)

РОТ-мпПЦР проводился с участием выделенных препаратов тотальных РНК (5 мкг), обратной транскриптазы Thermo Scientific Maxima Reverse Transcriptase («Thermo Fisher Scientific», Литва) и праймера oligo(dT)₁₈ («Thermo

Fisher Scientific», Литва) согласно стандартного протокола и рекомендациям фирмы [244].

На реакцию последующей мПЦР бралось по 2 мкл продукта обратной транскрипции (из 30 мкл реакционной смеси) и по 2 pmol каждого праймера (Таблица 2.1). Использовалась следующая программа для амплификатора GeneAmp PCR System 9700 («Applied Biosystems», США): 5 мин 94°C – 1 цикл; 30 сек 94°C, 30 сек 57°C, 1 мин 72°C – 30 циклов; 5 мин 72°C – 1 цикл. Продукты реакции анализировались с помощью электрофореза в 1,2% агарозном геле.

Таблица 2.1 – Нуклеотидная последовательность праймеров, использованных для диагностики картофеля на присутствие вирусных инфекций методом РОТ-мПЦР.

Название	Позиция в геноме*	Полная нуклеотидная последовательность	Размер фрагмента (нт)	Источник
#PVX-Forward	5664-5683	5' – tagcacaacacaggccacag – 3'	562	[245]
#PVX-Reverse	6205-6225	5' – ggcagcattcatttcagcttc – 3'		
#PVY-Forward	8723-8742	5' – acgtccaaaatgagaatgcc – 3'	480	[245]
#PVY-Reverse	9183-9202	5' – tgggtgttcgtgatgtgacct – 3'		
#PVM-Forward	7242-7264	5' – gaaagctgaaactgccaagatg – 3'	521	[245]
#PVM-Reverse	7737-7762	5' – catctgcagttatagcacctcttgg – 3'		
#PLRV-Forward	3653-3672	5' – cgcgctaacagagttcagcc – 3'	336	[245]
#PLRV-Reverse	3969-3988	5' – gcaatgggggtccaactcat – 3'		
#PVS-Forward	7543-7561	5' – tggcgaacaccgagcaaatg – 3'	187	[246]
#PVS-Reverse	7707-7728	5' – atgatcgagtccaagggcactg – 3'		
#PVS-new-Forward	7457-7477	5' – atgaaatgcggaggaatccgg – 3'	280	[247]
#PVS-new-Reverse	7690-7715	5' – actgctccagttgggaactcaacagt – 3'		

*Позиции праймеров были подобраны согласно доступным последовательностям изолятов из NCBI GenBank: EU571480.1 (PVX), NC001616.1 (PVY), NC001361.2 (PVM), AF453394.1 (PLRV), KC430335.1 (PVS)

Биоинформатические методы исследований

Сравнительный компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей гРНК вирусов, PVM и PVX выполнялся в «NCBI BLAST». Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей выполнялся в «MEGA-X» (v. 10.0.2) используя алгоритмы метода Neighbor-Joining. Сборка генома вирусов *de novo* осуществлялась в «Velvet» (v. 1.2.10) и «Oases» (v. 0.2.09).

Компьютерный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью программ «DNAMAN» (v. 5.2) и «SEQUENCING ANALYSIS» (v. 5.2). Полная нуклеотидная последовательность гРНК PVS собиралась с помощью метода парного выравнивания коротких перекрывающихся ДНК-фрагментов.

Элюция ДНК-фрагментов из агарозного геля

Очистка синтезированных ДНК-фрагментов проводилась методом элюции из 1,2% агарозного геля, используя наборы фирмы «Thermo Fisher Scientific» согласно протокола производителя [244].

Реакция секвенирования

Образцы ДНК для реакции секвенирования готовились с использованием реактивов фирмы «Applied Biosystems» (США). Реакционная смесь объемом 5 мкл содержала 80-200 нг ДНК-фрагмента и 10 pmol смыслового или антисмыслового олигонуклеотидов (Таблица 2.2 и Таблица 2.3). Использовалась следующая программа для циклического секвенирования: 2 мин – 94°C – 1 цикл; 10 с – 94°C, 5 с – 50°C, 4 мин – 60°C – 25 циклов. Продукты реакции были очищены с помощью колонок Centri-Sep согласно протоколу фирмы «Princeton Separations» (США). Очищенные образцы после денатурации (5 мин при 95°C) помещались в ДНК анализатор ABI 310 [244].

Таблица 2.2 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров, подобранных для клонирования кодирующих последовательностей OPC2-OPC6 PVS в состав агробактериального вектора pBIN19 и последующей транзientной экспрессии в системе *N. benthamiana* линии 16с

Кодирующая последовательность белка PVS (номер OPC)	Протяженность кодирующей последовательности OPC, нт	Нуклеотидная последовательность праймера	Сайт для действия рестриктаз
Для клонирования OPC изолятов «Fortune» и «Ushkonyr»			
25K-YN (OPC2)	732	Fw 5'- <u>cgtagtcgac</u> atgaggatat ttgatagctt-3'	<i>SalI</i>
		Rv 5'- <u>cgtagagctc</u> ttaggcggcg gtgtaagtgg-3'	<i>SacI</i>
12K (OPC3)	327	Fw 5'- <u>cgtagtcgac</u> atgccactta caccgccgcc-3'	<i>SalI</i>
		Rv 5'- <u>gtcaggtacc</u> ttaagcactg tgcactcg-3'	<i>Acc65I</i>
7K-YN (OPC4)	201	Fw 5'- <u>cgtagtcgac</u> atgctgtcca aggtgcaacc-3'	<i>SalI</i>
		Rv 5'- <u>gtcaggtacc</u> ttacctgtga acctaaaggt-3'	<i>Acc65I</i>
CP-YN (OPC5)	885	Fw 5'- <u>cgtagtcgac</u> atgccccca aaccggatcc-3'	<i>SalI</i>
		Rv 5'- <u>cgtaagatct</u> tcattggttg atcgattac ggt-3'	<i>BglIII</i>
11K-YN (OPC6)	285	Fw 5'- <u>cgtagtcgac</u> atgaaggcag accgtttagc-3'	<i>SalI</i>
		Rv 5'- <u>cgtaggtacc</u> tcacctcagt tactccaacc-3'	<i>Acc65I</i>
Дополнительные праймеры для клонирования OPC изолята «Ushkonyr»			
25K-ВУ (OPC2)	732	Fw 5'- <u>cgtagtcgac</u> atgaggaggt ttgacagctt-3'	<i>SalI</i>
		Rv 5'- <u>cgtagagctc</u> ttaggcgggtg gtgtaagtgg-3'	<i>SacI</i>
7K-ВУ (OPC4)	201	Fw 5'- <u>cgtagtcgac</u> atgttgccca aggtgcaatc-3'	<i>SalI</i>
CP-ВУ (OPC5)	885	Rv 5'- <u>cgtaagatct</u> tcattggttt gctgcattcc-3'	<i>BglIII</i>
11K-ВУ (OPC6)	285	Fw 5'- <u>cgtagtcgac</u> atgagagcgg aacgtctaaa-3'	<i>SalI</i>

Таблица 2.3 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров, использованных для клонирования кодирующих последовательностей белка оболочки (CP) и 25K PVS в состав вектора pCAMBIA2300 для стабильной трансформации картофеля.

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймера	Сайт для действия рестриктаз
#302	5'-cgtatctaga atgccgcca aaccggatcc - 3'	<i>Xba</i> I
#303	5'-cgtaccgagg atgccgcca aaccggatcc - 3'	<i>Sma</i> I
#304	5'-cgtaagatct tcattggtg atcgattac ggt -3'	<i>Bgl</i> II
#305	5'-cgtagtcgac tcattggtg atcgattac ggt -3'	<i>Sal</i> I
#306	5'-cgtaggatcc ttagggcgcg tgtaagtgg -3'	<i>Nco</i> I
#307	5'-cgtagagctc atgaggatat ttgatagctt -3'	<i>Sac</i> I
#308	5'-cgtaggatcc atgaggatat ttgatagctt -3'	<i>Bam</i> HI
#309	5'-cgtagtcgac ttagggcgcg tgtaagtgg -3'	<i>Sal</i> I
#711	5'-cgtatctaga tcattggtg atcgattac ggt - 3'	<i>Xba</i> I
#712	5'-cgtaagatct atgccgcca aaccggatcc - 3'	<i>Bgl</i> II
#713	5'-cgtagtcgac atgccgcca aaccggatcc - 3'	<i>Sal</i> I
#714	5'-cgtaccgagg tcattggtg atcgattac ggt - 3'	<i>Sma</i> I
#717	5'-cgtagtcgac atgaggatat ttgatagctt - 3'	<i>Sal</i> I
#719	5'-cgtagagctc ttagggcgcg tgtaagtgg - 3'	<i>Sac</i> I
#virD-Fw	5'-gaagaaagccgaaataaagag-3'	-
#virD-Rev	5'-ttgaacgtatagtcgccgata-3'	-

Рестрикция и лигирование фрагментов ДНК

Все буферы и ферменты, использованные для рестрикции и реакции лигирования, были получены от фирмы «Thermo Fisher Scientific» (Латвия). Условия реакций подбирались согласно каталогу выпускаемой продукции данной фирмы. При лигировании использовалось 250 нг вектора, от 12 до 60 нг вставки (в зависимости от длины фрагмента) и 1 единица T4 лигазы в 10-20 мкл. Инкубация проходила в течение ночи при 16°C или в течение 1 ч при комнатной температуре [244].

Трансформация клеток E. coli плазмидной ДНК

Лигазная смесь использовалась для трансформации компетентных клеток бактерий *E. coli* штамма DH5α [246]. Для проведения трансформации клетки были разморожены во льду, с добавлением раствора ДНК к 100 мкл компетентных клеток, размешивались и инкубировались во льду в течение 15-20 мин. После этого пробирки были помещены на водяную баню при температуре 42 С на 90 с, затем быстро охлаждались до 0 С, погружая пробирки в лед. После теплового шока к клеткам было добавлено 400 мкл среды LB и проведена инкубация при 37 С в течение 1 ч с умеренным встряхиванием. Клетки высевались на чашки Петри со средой LB и ампициллином 100 мг/л (или канамицином 100 мг/л для агробактериальных векторов). Из выросших за ночь колоний выделялась плазмидная ДНК [244].

Экстракция мини-препаратов ДНК

Плазмидная ДНК выделялась с помощью набора от фирмы «Thermo Fisher Scientific» согласно рекомендации, прилагаемой к набору. Концентрация и степень очистки ДНК определялась спектрофотометрически [244].

Электропорация клеток агробактерий

Для проведения электропорации были использованы компетентные клетки *Agrobacterium tumefaciens* штамма GV3101 и C5851. Для проведения электропорации к 40 мкл размороженных компетентных клеток агробактерий добавлялись 100-200 нг рекомбинантной ДНК, затем смесь переносилась в охлажденную кювету для электропорации с шириной зазора 0,1 см. Электропорация была проведена на приборе Gene Pulser («Bio-Rad», США) при следующем режиме: 200 Ом, 25 мкФ, 1,8 кВ. Длительность разряда составляла 4-5 мсек. Затем к клеткам добавлялось по 1 мл LB среды, с инкубацией на качалке в течение 1 ч при 25°C и последующем высевании на чашки с LB средой, содержащий 100 мг/л канамицина и 25 мг/л рифампицина [244].

*Культивирование растений *S. tuberosum*, *N. benthamiana**

Клубни картофеля *S. tuberosum* после 2-х месяцев культивирования при +4°C, высаживались в отдельные горшки с почвой. Семена *N. benthamiana* высевались в горшки с почвой в условия теплички. Культивирование растений в почве осуществлялось в световой комнате (16-и часовой световой период / 8 ч темноты при температуре 24-25°C).

*Инfiltrация растений *N. benthamiana* линии 16с*

Полученные из отдельных колоний агробактериальные клетки выращивались на качалке при 28°C в течение ночи в 20 мл жидкой среды LB, содержащей 100 мг/л канамицина и 50 мг/л рифампицина. Затем суспензия клеток центрифугировалась 8 мин при 7,1 тыс. x g и ресуспендировалась в 2 мл буфера (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, 100 мкМ ацетосирингона). Замерялась оптическая плотность раствора на Ultrospec 2000 («Pharmacia Biotech», Великобритания) при 600 нм и готовилась смесь двух суспензий до доведения конечной оптической плотности для клеток варианта «35S-GFP» до 0,1 о.е., а клеток варианта «35S-P19» и других ДНК-конструкций, содержащих кодирующие последовательности гРНК PVS – до 0,2 о.е. Клетки инкубировались в течение 2-х часов при комнатной температуре и использовались для инfiltrации листьев растений. Процедуру проводили с помощью шприца на 2 мл без иглы. Для облучения ультрафиолетовым светом была использована лампа PRO-4W/UV («PRO Intellect Technology») с длиной волны 490 нм.

Генетическая трансформация растений картофеля

Междоузлия картофеля размером 0,5-0,8 см инкубировались с ночной культурой агробактерий, разбавленной в MS-среде до оптической плотности 0,8 о.е. в течение 10 минут. Затем экспланты переносились на питательную среду для калусогенеза (соли MS, пиридоксин 1 мг/л, тиамин 1 мг/л, глюкоза 20 г/л,

мио-инозит 100 мг/л, НУК 5 мг/л, зеатин 0,1 мг/л, агар 0,7%) и инкубировались в течение 18-24 часов. После этого для элиминации агробактерий экспланты помещались на среду для калуссогенеза, содержащую 500 мкг/мл цефотаксима, и инкубировались 7 дней. Далее экспланты переносились на среду для морфогенеза (соли Мурасиге-Скуга, пиридоксин 1 мг/л, тиамин 1 мг/л, глюкоза 20 г/л, мио-инозит 100 мг/л, аденин 40 мг/л, пантотенат кальция 5 мг/л, биотин 1 мг/л, гидролизат казеина 1 г/л, нафтилуксусная кислота 0,02 мг/л, зеатин 1,5 мг/л, гиббереллин 0,5 мг/л, агар 0,7%) с 500 мг/л цефотаксима и 25 мг/л канамицина. Каждые 2 недели экспланты пересаживались на свежую среду до появления побегов. Через 5-6 недель от начала эксперимента появлялись побеги. Побеги длиной 0,5-1 см срезались и переносились в пробирки со средой для корнеобразования (соли Мурасиге-Скуга, сахароза 26 г/л, агар 0,7%), содержащей канамицин 20 мг/л и цефотаксим 500 мг/л.

Экстракция тотальной ДНК из растительной ткани

Выделение ДНК из растительной ткани проводилось СТАВ-методом с некоторыми модификациями [248]. Замороженные листья (1-2 см²) перемалывались в пробирках на 2 мл с помощью стеклянных палочек и с добавлением 700 мкл буфера (2% СТАВ, 2% PVP, 1,4 М NaCl, 20 mM ЕДТА, 100 mM Трис-НСl (рН 8,0), 2% β-МЭТ), прогретый до 65 С. Далее к препарату добавлялось по 2 мкл РНКазы 10 мг/мл с инкубацией при 65°С 15 мин.

После к образцам был добавлен равный объем хлороформа с последующим встряхиванием в течении 5 мин, центрифугированием 10 мин при 14 000 об/мин. Верхняя фаза переносилась в новую центрифужную пробирку на 1,5 мл и ДНК осаждалась 2/3 объема изопропанола. После инкубации 5 мин при комнатной температуре образцы центрифугировались, как и прежде, и промывались 70% этанолом, снова центрифугировались. Осадок подсушивался на воздухе. ДНК затем растворялась в 150 мкл стерильной деионизированной воды и переосаждалась равным объемом 4 М NaCl и двумя объемами 96% этанола. После инкубации при -20 С в течение ночи образцы были центрифугированы, осадок промыт 70% этанолом, с подсушиванием на воздухе и растворялся в 50-100 мкл деионизированной стерильной воды.

РНК экстракция и блот-гибридизационный анализ трансгенных растений картофеля

Препараты тотальных РНК трансгенных растений были выделены из ткани листьев картофеля методом СТАВ-LiCl [249]. Качество выделенных препаратов оценивалось на NanoDrop 2000c Spectrophotometer («Thermo Fisher Scientific», США). Блот-гибридизационный анализ малых РНК выполнялся по протоколу, предложенному Malpica-Lopez с соавт. [250] 10 мкг препарата тотальных РНК наносилось на 15% денатурирующий полиакриламидный гель с добавлением 7 М мочевины для разделения молекул. После электрофореза гель окрашивался в растворе бромида этидия. После оценки результатов электрофореза, РНК переносилась на нейлоновую мембрану Hybond-N+ («Amersham», США) используя EBU-4000 («С.В.С. Scientific», США). Мембрана была гибридизована

с двумя ³²P-меченными пробами специфичными к трансгенной вставке 25K PVS_25K_s и miR160_as, в качестве контроля (Таблица 2.4).

Таблица 2.4 – Последовательности ³²P-меченных олигонуклеотидных праймеров, использованных для гибридизации с малыми РНК трансгенных растений картофеля

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймера	Источник
PVS_25K_s	5'-atatatggatgtgttttgcaa-3'	[251]
miR160_as	5'-tggcatcacaggagccaggca-3'	

Анализ Illumina секвенирования трансгенных, вирусных и растительных тотальных РНК

Целостность РНК проверялась капиллярным электрофорезом на LabChip GX («Perkin Elmer», США). Секвенирование Illumina было выполнено в Fasteris AG (www.fasteris.com) с использованием протокола малых РНК TruSeq для подготовки библиотек и мультиплексирования 28 библиотек (включая 5 библиотек для картофеля ALYU-75 - ALYU-79 и 23 библиотеки не картофеля) в одной проточной кювете SP NovaSeq 6000, которое дало для библиотек картофеля от 31 627 721 до 35 869 294 прочтений с Q30= 94,42-94,66. Библиотеки были демultipлексированы с последующей обрезкой адаптера. Полученные считывания, большинство из которых находились в диапазоне размеров 20-25 нт и содержали функциональные миРНК и миРНК растений, а также вирусные миРНК были использованы для сборки *de novo* полных вирусных геномов с использованием конвейера, ранее разработанного для реконструкция геномов вирусов из культивируемых растений *Solanum* [252]. Избыточные чтения из 20–25 нт были собраны *de novo* с использованием «Velvet» (v. 1.2.10) и «Oases» (v. 0.2.09) с последующей фильтрацией Oases-контигов через геном *Solanum tuberosum* (PGSC_DM_v3_superscaffolds, PGSC_DM_v3_2.1.9_superscaffolds_unanchored, S_tuberosum_Group_Phureja-4,3-chloroplast). S_tuberosum_Group_Phureja_mitochondrion_DM1-3-516-R44, http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/pgsc_download.shtml) с использованием Burrow-Wheeler Aligner (BWA, v. 0.7.12) и создания каркасов нерастительных контигов с помощью модуля SeqMan программного обеспечения Lasergene DNASTAR LUX (v. 7.1.0). Контиги SeqMan корректировались вручную и проверялись путем обратного картирования избыточных прочтений 20-25 нт и анализа результатов картирования с помощью MISIS-2 [253] для получения согласованной последовательности каждого вирусного генома. Для анализа растительных, вирусных и трансгенных миРНК считывания 20-25 нт (или 15-34 нт) из каждой библиотеки были картированы на эталонные последовательности генома *S. tuberosum*, геномы PVS (реконструированные только из образца ALYU-75) и PVY (реконструированные из образцов ALYU-75, ALYU-76 и ALYU-79), а также на экспрессионную кассету «S-25K-AS». Сопоставленные чтения были проанализированы с использованием собственных считываний для подсчета растительных, вирусных и трансгенных мРНК, отсортированных по

размеру (20, 21, 22, 23, 24, 25 нт, всего 20-25 нт), полярности (прямая, обратная, всего) и идентичности 5'-концевых нуклеотидов (5'A, 5'C, 5'G, 5'U).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Вирусы картофеля в двух регионах Казахстана

Для анализа использовали образцы листьев растений картофеля из Алматинской области и листья и клубни картофеля с полей Костанайской области. Клубни картофеля перед испытанием проращивали в индивидуальных горшках в лабораторных условиях. После 1 месяца выращивания, листовые диски использовали для ИФА и РОТ-мпПЦР анализов на присутствие в образцах пяти вирусных инфекций – PVM, PVS, PVY, PVX и PLRV. Всего было проанализировано 119 образцов растений из Алматинского региона и 138 образцов из Костанайской области. Листья и клубни были собраны в 2013 – 2015 годах, соответственно.

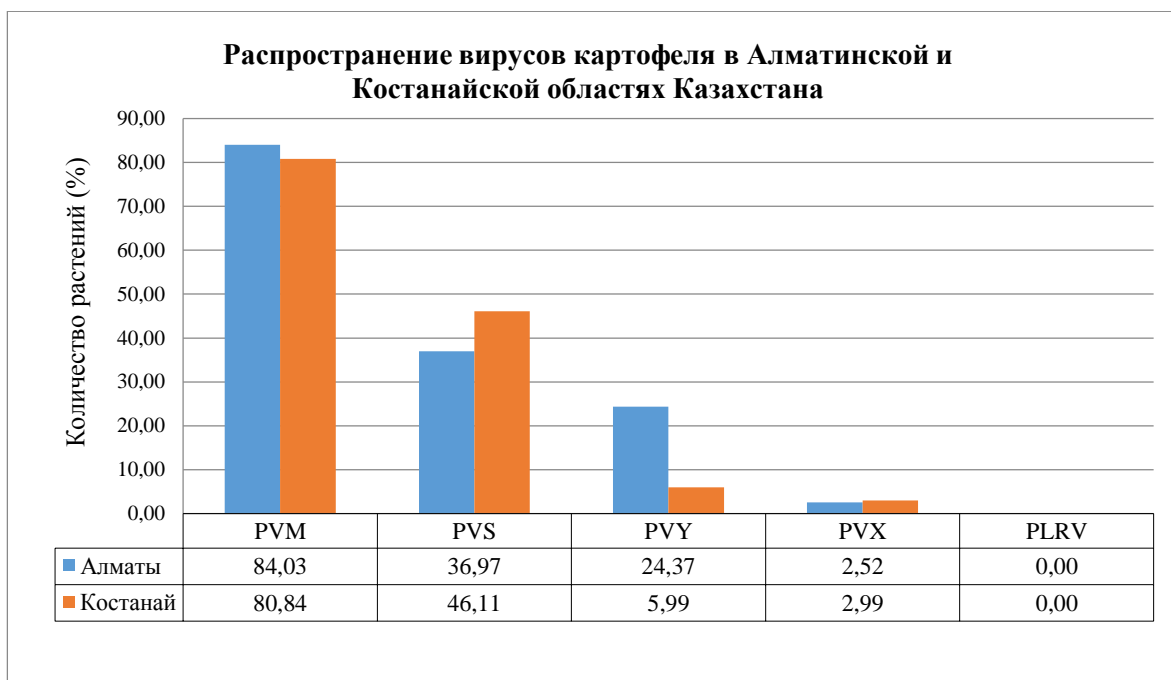
В исследованных образцах картофеля были обнаружены PVM, PVS, PVY, PVX. PLRV не удалось диагностировать ни в одном образце, хотя считается, что этот вирус распространен повсеместно на территориях, занятых под картофелеводство [254, 255]. Это свидетельствует о том, что в 2013-2015 гг. PLRV на территории юго-востока и севера Казахстана отсутствовал. Эти результаты связаны с тем, что на территории Казахстана отсутствует переносчик вируса – персиковая тля *Myzus persicae*.

Самым распространенным вирусом картофеля на территории Казахстана является PVM (Рисунок 3.1, А). Общее количество образцов, зараженных этим вирусом, составило: для Алматинской области – 84,03%, для Костанайской области – 80,84%. PVS более распространен на севере Республики (46,11% против 36,97%), а PVY, напротив, более характерен для юго-востока Казахстана (24,37% против 5,99%). Уровень заболеваемости PVX был практически равен для Алматинской и Костанайской областей и составлял 2,52% и 2,99%, соответственно.

Согласно литературным данным [256-259], на территории Республики Казахстан степень поражения картофеля вирусными инфекциями в 1994-1996 гг. доходила: PLRV – до 85,7%, PVM – до 85,7%, PVS – до 100%, PVX – до 96%, PVY – до 85,7%. Соответственно, наиболее распространенными являлись PVS и PVX, хотя уровень зараженности другими вирусами был также очень высок. В 2014 году в Южном регионе Казахстане показатель зараженности картофеля составлял: PLRV – 5%, PVM – 8,5%, PVS – 31,7%, PVX – 41,9%, PVY – 14,5% [259]. Приведенные данные также свидетельствуют о преобладании PVX и PVS, хотя общий уровень зараженности растений картофеля вирусами ниже в 2-3 раза по сравнению с серединой 1990-х годов.

Изучение распространенности вирусных инфекций в Восточном Казахстане, свидетельствует о преобладании PVM (10 сортов из 15 были заражены), уровень заболеваемости PVS и PVY был одинаков (по 4 сорта из 15) [260]. Самый низкий уровень распространения наблюдался у PVX – 3 сорта из 15 были заражены.

А



Б



Рисунок 3.1, лист 1 – Оценка распространения вирусных инфекций на территории Казахстана. А – Уровень общего распространения вирусов на территории двух областей Казахстана – Алматинской и Костанайской. Б – Уровни распространения одиночных и комплексных вирусных инфекций на территории Алматинской и Костанайской областей. В – Сравнение эффективности обнаружения вирусных инфекций в образцах картофеля методами ИФА и РОТ-мпПЦР [247].

В

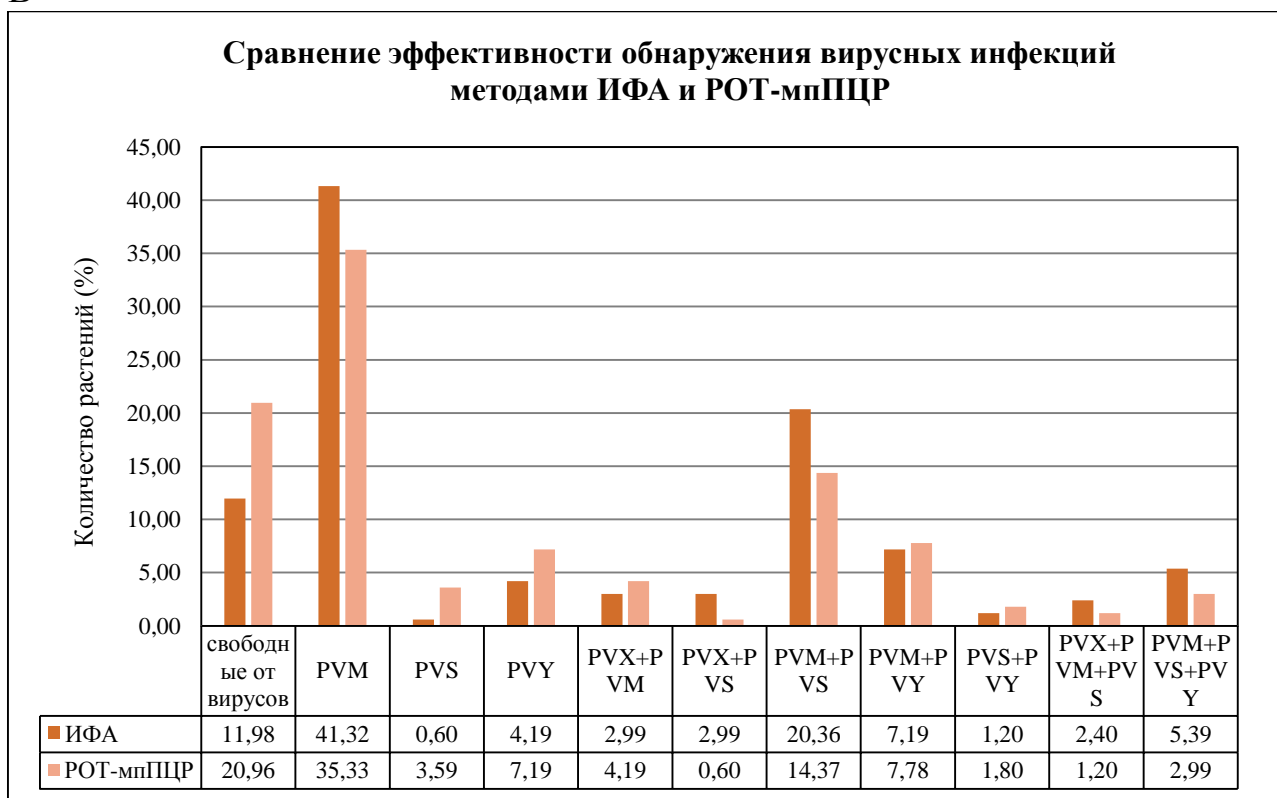


Рисунок 3.1, лист 2.

На основании полученных результатов, в настоящее время уровень инфицирования картофеля на территории Казахстана PVX и PVY снизился, а PVM и PVS вырос. Изменение уровня распространенности вирусов также зависит от качества ввозимого на территорию Казахстана семенного материала. Полученные результаты свидетельствуют не только о значительном распространении вирусов на территории Казахстана, но и о том, что степень преобладания того или иного вируса не является постоянной и изменяется в течение времени.

3.1.1 Одиночная и комплексная вирусная инфекция

При изучении уровня заболеваемости картофеля также сравнивалась степень распространенности одиночных и комплексных инфекций в Алматинской и Костанайской областях (Рисунок 3.1, В). Одиночная (моновиральная) инфекция представляет собой заражение только одним видом вируса. В условиях Казахстана такими инфекциями являются PVM, PVS и PVY. Комплексной инфекцией называют заражение растения двумя и более видами вирусов. В литературе встречаются данные, что в составе комплексной инфекции картофеля было обнаружено до пяти различных видов вирусов одновременно [254]. В настоящем исследовании были установлены образцы картофеля, зараженные тремя видами вирусов одновременно. Характерной особенностью распространения вирусов на территории Казахстана являлся тот

факт, что PVX встречался только в составе комплексной инфекции с PVM либо в смеси PVM + PVS.

Для юго-востока Казахстана уровень заболеваемости картофеля моновирусными инфекциями был следующий: PVM – 36,13%, PVS – 0,84%, PVY – 5,88%. В северном регионе единственным представителем одиночных инфекций был PVM – 28,74%, PVS и PVY были обнаружены только в составе комплексных инфекций. Общий уровень одиночной инфекции был следующий: для Алматинской области – 42,85%, для Костанайской области – 28,74%.

Уровень распространения комплексных инфекций варьировал между двумя регионами. В Алматинской области он составлял 47,91%, тогда как в Костанайской области он был на уровне 52,1%. Среди комплексных инфекций наиболее распространенным было сочетание PVM + PVS: в Алматинской области – 26,89%, в Костанайской области – 43,11%. Соотношение смешанной инфекции PVM + PVY составляло: в Алматинской области – 10,08%, в Костанайской области – 4,19%. Тогда как уровень распространения PVM + PVX был примерно одинаков для обоих регионов – 1,68% для Алматы и 1,8% для Костаная. Присутствие в образцах инфекции PVS + PVY было обнаружено только в Алматинской области (0,84%), а в Костанайской области полностью отсутствовало. Установлено, что в трехсоставной инфекции основным был род карлавирусов (PVM и PVS), где третьим вирусом был либо PVX, либо PVY. Комплексная инфекция состава PVM + PVS + PVX встречалась в образцах из Алматинской области (0,84%) и Костанайской области (1,2%) и была примерно на одном уровне. Однако, комплекс вирусов PVM + PVS + PVY чаще встречался в Алматинской области (7,56%), чем в Костанайской (1,8%).

Общее количество образцов растений картофеля, свободных от вирусного поражения, составляло: в Алматинской области – 9,24%, а в Костанайской области – 19,16%. Таким образом, подтвердилось предположение, что картофель, выращиваемый в регионах с прохладным климатом, менее подвержен вирусному заражению. Уровень заболеваемости картофеля PVX не зависит от климатических условий регионов Казахстана. Основным типом вирусных инфекций картофеля в Республике на сегодняшний день является сочетание PVM + PVS.

3.1.2 Сравнение эффективности методов ИФА и РОТ-мпПЦР

Поскольку чувствительность методов анализа является основополагающим фактором для диагностики вирусных инфекций, сравнивалась эффективность методов ИФА и РОТ-мпПЦР для обнаружения вирусов в растительных пробах из Алматы и Костаная (Рисунок 3.1, В). Одиночные инфекции PVS и PVY эффективнее обнаруживались методом РОТ-мпПЦР (3,59% и 7,19%) в отличие от ИФА (0,6% и 4,19%, соответственно). Для PVM наиболее результативным оказался метод ИФА – 41,32% против 35,33% согласно РОТ-мпПЦР. PVM не обнаруживался методом РОТ-мпПЦР, если его показания на ИФА не превышали 0,4 ед. от отрицательного контроля. Хотя согласно рекомендациям производителя набора для ИФА, такой результат считается положительным. По-видимому, это связано с особенностями

нуклеотидной последовательности геномной РНК (гРНК) и аминокислотной последовательности белков оболочки изолятов PVM, распространенных на территории Казахстана. Имеются данные, что эффективность наборов для ИФА напрямую коррелирует с территориальными особенностями вируса PVM, распространенными в местах производства наборов для диагностики [254]. Несмотря на то, что для РОТ-мпПЦР были использованы праймеры, комплементарные консервативным участкам гРНК, кодирующим белок оболочки PVM, точно ответить на вопрос, сколько вариантов изолятов этого вируса распространено в Казахстане без проведения дополнительных исследований не представляется возможным. Таким образом, PVM эффективнее обнаруживался методом ИФА, что также повлияло на результаты обнаружения комплексной инфекции.

Результаты оценки эффективности методов ИФА и РОТ-мпПЦР при обнаружении комплексных инфекций были неоднозначны. Так, инфекции состава PVX + PVM, PVM + PVY и PVS + PVY с большей точностью обнаруживались методом РОТ-мпПЦР (4,19%, 7,78% и 1,8%, соответственно, против диагностики методом ИФА 2,99%, 7,19% и 1,2%). Методом ИФА эффективнее диагностировались комплексные инфекции PVX + PVS (2,99% против диагностики методом РОТ-мпПЦР 0,6%), PVM + PVS (20,36% против 14,37%), PVX + PVM + PVS (2,4% против 1,2%) и PVM + PVS + PVY (5,39% против 2,99%).

Необходимо отметить, что вирус PVM являлся доминирующим при комплексной вирусной инфекции. Низкая эффективность метода РОТ-мпПЦР при диагностике комплексных вирусных инфекций могла быть связана с доминированием гРНК PVM по сравнению с другими РНК в клетке-хозяине. При проведении РОТ-мпПЦР происходило использование компонентов реакции на синтез фрагментов доминирующего вируса PVM. А метод ИФА направлен на обнаружение только одного вида вируса, при этом нет конкуренции между различными видами вирусов за компоненты реакции. Так же этот метод позволяет использовать для анализа замороженный материал, тогда как для РОТ-мпПЦР предпочтительнее исследовать свежий образец.

Часто расхождение между результатами ИФА и РОТ-мпПЦР происходило при диагностике PVS, при этом наличие вируса подтверждалось только методом ИФА. По нашему мнению, это связано с разнообразием изолятов вирусов, распространенных в Казахстане. Для различных изолятов характерно наличие особенностей нуклеотидного состава гРНК, при этом аминокислотный состав белков остается практически идентичным. До настоящего времени информация о разнообразии изолятов вирусов PVS и PVM на территории Республики Казахстан отсутствовала.

3.1.3 Компьютерный анализ геномной РНК PVS

В настоящее время известны полные кодирующие последовательности многих изолятов вируса PVS. Проведенный сравнительный анализ геномов и аминокислотных последовательностей белков трех известных вариантов позволил обнаружить различия изолятов вируса (Таблица 3.1 и Рисунок 3.2).

Изолят «Yunnan YN» обнаружен на территории Китая (NCBI GenBank: KC430335), изолят «Vltava» – на территории Чехии (AJ863510), изолят «RL5» – в Колумбии (JX683388). Их геномы представлены одноцепочечной положительно заряженной гРНК размером 8238-8488 нт и имеют сходство с геномной организацией других представителей карлавирусов. Внутри гРНК PVS каждого из трех изолятов было обнаружено по шесть открытых рамок считывания (OPC1-6), кодирующих белки 223 К, 25 К, 12 К, 7 К, 34 К (белок оболочки или СР-белок) и 11К соответственно. В Таблице 3.1 представлены размеры кодирующих последовательностей всех белков для различных изолятов PVS.

Таблица 3.1 – Расположение открытых рамок считывания в гРНК и размеры кодируемых белков различных изолятов PVS

Обозначение изолята (размер генома в нт), авторы, место обнаружения	Наименование UTR или белка (номер открытой рамки считывания)	Положение OPC на гРНК	Размер последовательности (в нт)	Количество кодируемых аминокислот
“Yunnan YN” GenBank: KC430335 (8488) Abouelnasr H.M., Han C.G.; Китай	5'-UTR	1-60	60	-
	223К (OPC1)	61-5988	5928	1976
	25К (OPC2)	5975-6706	732	244
	12К (OPC3)	6684-7010	327	109
	7К (OPC4)	6974-7174	201	67
	СР (OPC5)	7216-8100	885	295
	11К (OPC6)	8097-8381	285	95
3'-UTR	8382-8481	100	-	
“Vltava” GenBank: AJ863510 (8464) Matousek J., Schubert J., Ptacek J., Kozlova P., Dedic, P.; Чехия	5'-UTR	1-62	62	-
	223К (OPC1)	63-5978	5916	1972
	25К (OPC2)	5965-6696	732	244
	12К (OPC3)	6674-7000	327	109
	7К (OPC4)	-	-	-
	СР (OPC5)	7203-8084	882	294
	11К (OPC6)	8081-8362	282	94
3'-UTR	8363-8464	102	-	
“RL5” GenBank: JX683388 (8238) Gutierrez P.A., Marin M., Alzate J.F.; Колумбия	5'-UTR	-	-	-
	223К (OPC1)	1-5601	5601	1867
	25К (OPC2)	5602-6296	696	232
	12К (OPC3)	6297-6623	327	109
	7К (OPC4)	6587-6787	201	67
	СР (OPC5)	6829-7713	885	295
	11К (OPC6)	7710-7994	285	95
3'-UTR	7995-8238	244	-	

Как видно из представленных в Таблице 3.1 данных, протяженность каждой OPC варьирует незначительно в зависимости от изолята. Выделяется только одна последовательность OPC4, кодирующая белок 7К. У изолятов «Yunnan YN» и «RL5» ее длина составляет 201 нт или 67 аминокислотных остатков. У изолята

«Vltava» последовательность OPC4 в гРНК отсутствует.

A

```

*****
PVX  MSAQGHRRLTAPVNSEKVIIVLGLSFALISITFLLSRNSLPHVGDNIHSLPHGGGAYRDGTKAVLNSFNFGSRTLSLNGK---
PVM  MPLTPPPDPFTKYLASAALGVSLALVWVLLIRSTLFPVVGDRDHNLPHGG-WYRDGTKSVFVNSP--GRLNSIEARKAPL
PVS-1 MPLTPPPNTGLYIAAALGVSLAAIVALFTRSTLFPVVGDSQHNLPHGG-RYRDGTKAIDYFKP--AKLNSVEPGNH-W
PVS-2 MPLTPPPNTGLYIAAALGVSLAAVVALFTRSTLFPVVGDSQHNLPHGG-RYRDGTKAIDYFKP--TKLNSVEPGNY-W

PVX  -NAFAFVVLILLSLIYGRCLSQRNHL--ACGNNHSSH
PVM  LGQPWAIIVLL-VLLIWAHSHKLRPN--CRACAGSHT
PVS-1 YAQPWLLVLLI-VALICLSGRHAPC---CPRCNRVHSA
PVS-2 YTQPWLLVLLI-VALICLSGRHAQC---CPRCNRVHSA

```

B

```

*****
PVX  MDILIIISKSLGYSRTARPLDSSFLVVHAWAGAGKSTALSKLLARHSTFTVHTLVDPDKISIRTRGTQK---PGPIPEGNIA
PVM  MDVIVDLIYKYKFERLSNKL-VCFIVVHCVPGAGKSSLIREFLELDSRFCAITAGVEDQRLSGNWRK--WSGQQPEGKQV
PVS-1 MDVFLQILNKYKFERVSSTLNK-FIVVHSVPGAGKSSAIRELLKLDSTRFCITRGRPDIPNLEGAFI-KAERSG---EDKLL
PVS-2 MDVFLQILNKYKFERVSSTLNK-FIVVHSVPGAGKSSAIRELLKLDSTRFCITRGRPDIPNLEGAFI-KAERSG---ESKLL

PVX  ILDEYTLDTATTREAYQALFADPYQAPELALEP--HFYLETSFRTPTKAAALIASCFDFETNSQEEGHLEITGIF-KGPLLG
PVM  VLDEYTL-LTEVPPVFALFGDFIQSNT-SAVQRADEVCSVSRFFGSATCGLLRELQWN--VRSEKADLVQVSDIYTKDEL-G
PVS-1 LVDEYIE-GPVPEDAFALFADPLQSTAAAPY-RAHFIKTLSHRFGECTASLLRDLGWD--VQAEQDQSVQIADIFTVDPRET
PVS-2 LVDEYIE-GPIPEDAFALFADPLQSTAVLPH-RAHFIKTLSHRFGKCTDSLRLDLGWD--VQAEQDQSVQIADIFTVDPRET

PVX  KVI AIDSLAETTISRHGVEFVKPCQVTELEFPVVTIVSAAPIEEIGQSTLFYNAITRSKG-LTYVRAGA
PVM  KVVFSSEEVGCLLRSHGVEALSLEQIETQTFEVVTFVTSSENSPVINRAAA-YQCMTRHRTALHILCPDATYTAA
PVS-1 IVYF-EPEVGEELRSHGVEASCIGEVRCATFEHVTFTVTSENGPLVDKAAA-FQCLTRHTKSLILILCPDATYTAA
PVS-2 IVYF-EPEVGEELRSHGVEASCIGEVRCATFEHVTFTVTSENSPLIDKASA-FQCLTRHTKSLILILCPDATYTAA

```

B

```

PVX  MGDSTKKAETAKDEGTSQERREARPL-PTAADFEGKDTSENTDGRAADADGEMSLER-RLDLSREFLRERRGAI RVTNPGLE MTPPANTQAVGS
PVM  MPPKPDPTSSGEAPQAIPLAPPNRNVEEHRVGPSQ-GHGQNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIGR
PVS-1 MPPKPDPTSSGEAPQAMQPAPPPR-AEGHMYAQPE-GPGQNEEAMLEQRLIRLIELMATKRHNSTLSNISFEIGR
PVS-2 MPPKPDPTSSGEAPQAMPPAPPPRNSEGHRSQAQSE-APGQNEEAMLEQRLVRLIELMATKRHNSTLSNISFEIGR
PVS-3 MPPKPDPTSSGEAPQAMPPAPPPRNSEGHRSQAQSE-APGQNEEAMLEQRLVRLIELMATKRHNSTLSNISFEIGR

PVX  TKSTTTTGA-GATPANSGLFTIPDGDFRRTAKAVVASDAVHTKELSETQSIWKNNKVPDTMTQAAWTLVRHCADDGSSAQ
PVM  TGRPRLQLAENMRDPDTPNPNRPSIEALSRIKPIAISNNMATSDDMMRTYVNLEGLGVPTHEHVQVVIQAVLFCKDASSVVF
PVS-1 ---PSLEPTHEMRNPENPYSRFSIDELFKMEIRSVSNMANTEQMAQTADIAGLGVPTHEHVAQVILKVVIMCASVSSSVY
PVS-2 ---PSLEPTPEMRNPENPYSRFSIDELFKMEIRSVSNMANTEQMAQTADIAGLGVPTHEHVAQVILKVVIMCASVSSSVY
PVS-3 ---PSLEPTPEMRNPENPYSRFSIDELFKMEIRSVSNMANTEQMAQTADIAGLGVPTHEHVAQVILKVVIMCASVSSSVY

*****
PVX  TEMICTGPYSNC--VSRARLAAAIKEVCTLRQFKKYAPVWVNWMLTNNSEPANQAQGFKPEHKTAAFDFDGTNPAALTP
PVM  LDRGSEFEWPRGAI TADAVLAVLKLDAETLRRVCRLYAPVWVWVHMLTHNAPPADWAAMGFQYEDREAAAFDFDYVENTAAVQP
PVS-1 LDPAGTVEEFTCAVPLDSIIAIM-KNRAGLRKVRCLYAPVWVWVYMLVQNRFPSPDQAMGFQOWNARFAAFDFDYVTNGAAIQP
PVS-2 LDPAGTVEEFTCAVPLDSIIAIM-KNRAGLRKVRCLYAPVWVWVYMLVQNRFPSPDQAMGFQOWNARFAAFDFDYVTNGAAIQP
PVS-3 LDPAGTVEEFTCAVPLDSIIAIM-KNRAGLRKVRCLYAPVWVWVYMLVQNRFPSPDQAMGFQOWNARFAAFDFDYVTNGAAIQP

PVX  KEGIMRPPSEAEENNAQTAAFVKITKARAQSNDFASLDAAVTRCRITGTVAEAVVSLPPP
PVM  LEGIIRRP TPREKVAHNTHKDIAVRGANRNQV-FSSLNAEVTGCMNGPELTRDYVKSNRK
PVS-1 VEGIIRRP TPEETIAHNAHKSMAIDKSNRNER-LANTNVEYTGCMGAEIVRNHRNAINQ
PVS-2 VEGIIRRP TPEETIAHNAHKSMAIDKSNRNER-LANTNVEYTGCMGAEIVRNHRNAINQ
PVS-3 VEGIIRRP TPEETIAHNAHKSMAIDKSNRNER-LANTNVEYTGCMGAEIVRNHRNAINQ

```

Рисунок 3.2 – Сравнение аминокислотных последовательностей белков 12K (A), 25K (Б) и белка оболочки (В) вирусов PVX, PVM и PVS. Зеленым цветом выделены места полной гомологии аминокислотных остатков, серым цветом – места частичной гомологии, звездочками помечены консервативные домены (пояснения далее в тексте), PVS-1 – изолят “Yunnan YN” PVS, выделенный на территории Китая, PVS-2 – изолят “Vltava” PVS, выделенный на территории Чехии, PVS-3 – изолят “RL5” (Колумбия).

При проведении сравнительного анализа аминокислотных последовательностей белков, кодируемых гРНК различных изолятов PVS, с гРНК двух других вирусов PVM и PVX, выяснилось, что наиболее консервативные последовательности несут белки оболочки этих трех видов вирусов (ОРС5), а менее консервативные последовательности – белки 25К (ОРС2) и 12 К (ОРС3) (согласно Рисунку 3.2). Белки, кодируемые ОРС1, ОРС4 и ОРС6 имеют очень низкую степень гомологии, что согласуется с ранее полученными данными [13, 19].

Как видно из Рисунка 3.2, В, консервативный домен белка оболочки находится ближе к С-концу, определен как домен YAPV...EGL (выделен сверху звездочками). Присутствие этого домена характерно для вируса PVM [20, 21], который принадлежит к тому же роду карлавирусов, а также для вируса картофеля PVX [23, 24], который относится к роду потексвирусов. Кроме того, на рисунке хорошо видны отличия одного изолята PVS от другого. Так внутри обнаруженного домена у изолята «Yunnan YN» присутствует треонин (Т), а у изолята «Vltava» – аланин (А). А ближе к N-концу белка от консервативного домена у варианта «RL5» стоит серин (S), тогда как у двух других вариантов – пролин (Р).

Хотя аминокислотные последовательности белков 12К и 25К у трех сравниваемых изолятов PVS имеют больше различий, чем белки оболочки, на N-конце этих белков были обнаружены консервативные домены размером около 26 аминокислотных остатков для белка 12К и около 20 аминокислот – для белка 25К. Эти же домены присутствуют у вирусов PVM и PVX (помечено звездочками на Рисунке 3.2, А и Б).

3.1.4 Разнообразие изолятов PVM и PVS в Республике Казахстан

PVM и PVS являются родственными и входят в группу карлавирусов. Согласно NCBI GenBank, существует множество локальных популяций этих вирусов, распространенных в различных регионах мира и имеющих особенности нуклеотидного состава гРНК. PVS подразделяется на три подгруппы Andean (PVS^A), Ordinary (PVS^O) и Antioquia (PVS^P) [261]. Две подгруппы PVS^A и PVS^O распространены по всему миру и представлены множеством различных изолятов. Считается, что подгруппа PVS^A более агрессивна по отношению к растению-хозяину. В то время как PVS^O не наносит существенного вреда посадкам картофеля и является умеренным вирусом.

Гипотеза о наличии в Казахстане различных изолятов рода карлавирусов была подтверждена при проведении компьютерного анализа последовательностей гРНК, кодирующих белки оболочки изолятов PVS. Так, оказалось, что праймеры, использованные для идентификации европейского изолята PVS (размер фрагмента при амплификации РОТ-мпПЦР составляет 187 нт) имели неполную комплементарность к изолятам, впервые обнаруженным в Китае и Южной Америке. При использовании для РОТ-мпПЦР олигонуклеотидов, подобранных к наиболее консервативному региону гРНК, эффективность обнаружения PVS резко возросла. На Рисунке 3.3, А представлены результаты РОТ-мпПЦР анализа некоторых образцов картофеля

из Алматинской области. В пробах 1 и 2 присутствовали фрагменты ДНК, по размеру соответствующие PVM (520 нт) и PVS (280 нт). Причем в этих образцах отсутствовал фрагмент ДНК размером 187 нт, который бы свидетельствовал о наличии европейского изолята. В образцах 7, 8 и 9 присутствовали фрагменты ДНК, соответствующие европейскому изоляту PVS, поскольку в этих пробах были идентифицированы оба фрагмента ДНК, характерные для этого вируса – 187 нт и 280 нт. Фрагмент ДНК размером 280 нт является универсальным для идентификации всех изолятов PVS.

При проведении анализа образцов картофеля, полученных из Костанайской области, было обнаружено, что результаты диагностики PVM не совпадают между двумя методами. Было решено использовать метод униплекс ОТ-ПЦР для диагностики PVM в этих пробах. В результате амплификации в образцах 2, 4, 6, 7, 8 и 9 было идентифицировано два фрагмента ДНК – ожидаемый фрагмент, размером 520 нт и более тяжелый ~ 630 нт (Рисунок 3.3, Б). Пробы 1, 5 и 10 содержали один фрагмент ДНК, соответствующий ожидаемому размеру 520 нт. В образце 3 был обнаружен облегченный вариант фрагмента ДНК, размером ~ 500 нт. Таким образом, на территории Костанайской области существует три различных популяции PVM.

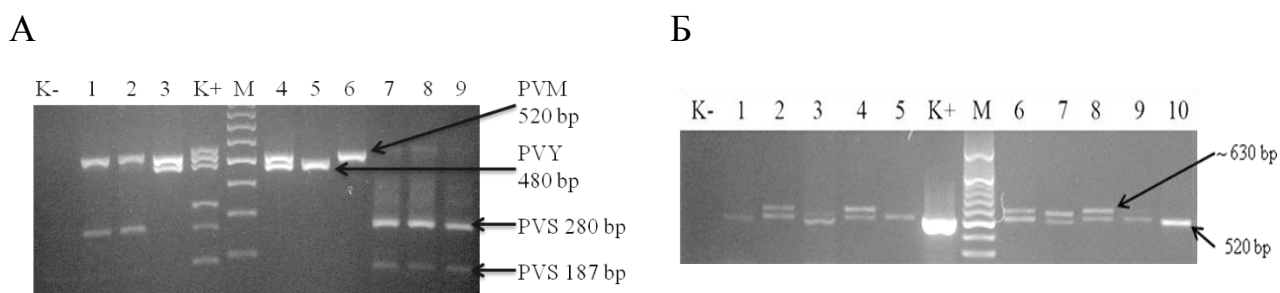


Рисунок 3.3 – Результаты электрофореза продуктов РОТ-мпПЦР. К- отрицательный контроль, К+ - положительный контроль, М – маркерная ДНК (GeneRuler™ 100 нт). А – Результаты электрофореза в 2% агарозном геле продуктов РОТ-мпПЦР при диагностике образцов картофеля из Алматинской области. 1-9 – номера проб, стрелками указаны амплифицированные фрагменты ДНК для PVM (размер фрагмента 520 нт), PVY (размер фрагмента 480 нт), PVS (размер фрагмента 280 нт и 187 нт). Б – Результаты электрофореза в 1,5% агарозном геле продуктов униплекс РОТ-ПЦР при диагностике PVM в образцах из Костанайской области. 1-10 – номера проб, стрелками указаны соответствующие фрагменты ДНК [247, 262].

В результате проведенных анализов на территории Казахстана были выявлены два изолята PVS и три изолята PVM (Рисунок 3.3). полученные результаты свидетельствуют о большом разнообразии изолятов двух карлавирусов картофеля, которые могли быть завезены в Казахстан как из Европы, так и из Китая.

3.1.5 Разнообразие изолятов PVS в Казахстане

14 случайных образцов зараженного вирусной инфекцией картофеля, были использованы для выявления разнообразия изолятов PVS на территории Казахстана и их штаммовой принадлежности. Центральный регион белка оболочки PVS размером 187 нт, кодирующий 57 аминокислотных остатков белка (на Рисунке. 3.2, В выделены чертой) был выбран в качестве цели для секвенирования и последующего анализа нуклеотидной последовательности соответствующих ДНК-фрагментов. Эта аминокислотная последовательность является наиболее консервативной для трех штаммов PVS, но отличается от последовательности соответствующего района СР-белка вирусов PVX и PVM.

С помощью программы MEGA-X (версия 10.0.2) секвенированные последовательности ДНК 14 казахстанских вариантов PVS были использованы для филогенетического сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей (Рисунок 3.4), результаты которого позволили выделить на территории Казахстана варианты вируса PVS, относящиеся к двум различным штаммам PVS⁰ и PVS^A. Согласно литературным данным [25, 26], различия этих штаммов состоят в особенностях распространения инфекции PVS в индикаторном растении *Chenopodium amaranticolor*. PVS^A распространяется системно, в то время как PVS⁰ имеет только локальное распространение в местах инокуляции. Каждый штамм подразделяется на группы соответственно особенностям нуклеотидного состава – PVS^A на три подгруппы (от А-I до А-III); PVS⁰ – на шесть подгрупп (от О-I до О-VI).

Изолятов, относящихся к подгруппам А-I и А-III на территории Казахстана не было выявлено (Рисунок 3.4). Среди секвенированных казахстанских вариантов вируса было установлено, что три образца KZ13-08-04, KZ14-04-8K и KZ2-16i относились к андскому штамму PVS^A, подгруппы А-II и наиболее близки к изолятам PVS, обнаруженным в Китае. Близкое родство и схожесть нуклеотидной последовательности казахстанских изолятов PVS^A подгруппы А-II с китайскими вариантами вируса KF011272, KF225470 и MF033144 позволяет предположить, что указанные изоляты были завезены в Республику Казахстан из Китая вместе с клубнями картофеля, использованным в качестве посадочного материала.

Остальные 11 секвенированных вариантов вируса относились к штамму PVS⁰, имеющему более широкое распространение по всему миру. Наибольшее количество (6 вариантов) казахстанских изолятов имело сходство с представителями подгруппы О-I, к ним относились KZ5-15p, KZ10-86, KZ11-93, KZ12-96, KZ5-11p и KZ1-6i. В эту группу, помимо казахстанских вариантов вируса входили изоляты из Ирана (HQ875136 и HQ875139), Китая (KF011280 и AY512653) и Нидерландов (GU319953). Следующая большая группа изолятов была объединена в подгруппе О-III, включившая в себя три казахстанских варианта KZ1-10i, KZ13-08-43 и KZ2-2i, а также варианты вируса из Китая (DQ315387 и KC430335), Танзании (KC866620) и Ирана (HQ875142). Оставшиеся два казахстанских варианта вируса KZ11-PVS и KZ9-80 относились к подгруппам О-II и О-IV, соответственно.

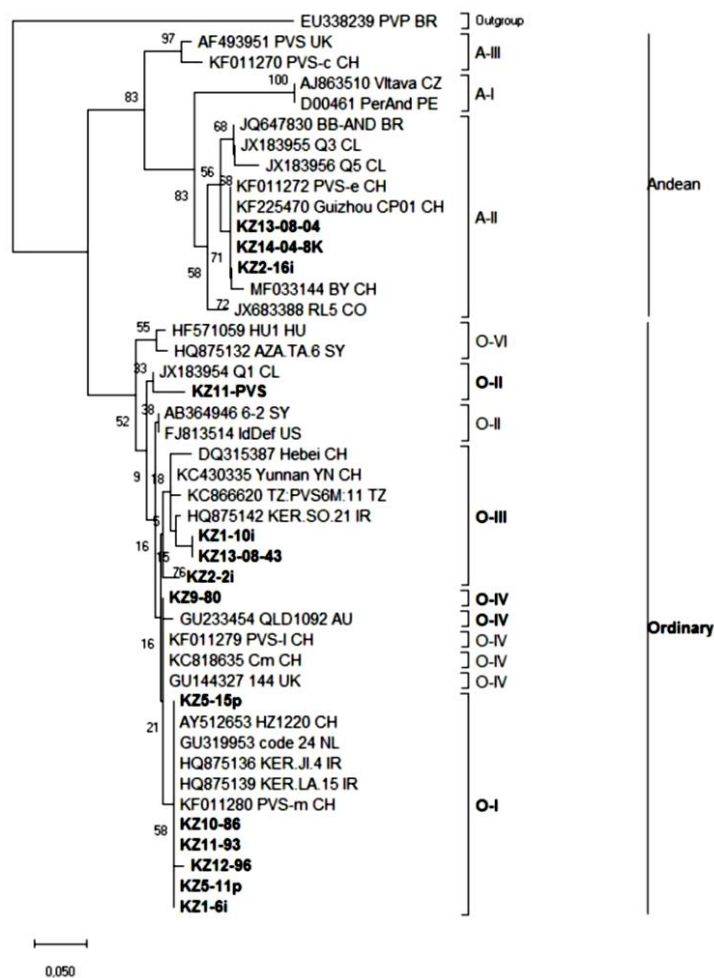


Рисунок 3.4 – Филогенетическое дерево, построенное по результатам сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей центральной области белка оболочки 44 изолятов PVS, на основе алгоритмов метода Neighbor-Joining (MEGA-X). Рядом с ветвями показан процент повторяющихся деревьев, в которых связанные таксоны сгруппированы вместе в тесте начальной загрузки (2000 повторений). В качестве внешней группы (out-group) использовали изолят *Potato virus P* из Бразилии. Казахстанские изоляты выделены **жирным** шрифтом [263].

В подгруппу O-II, помимо казахстанского изолята KZ11-PVS, вошел так же вариант вируса, изолированный в Чили (JX183954), а в подгруппу O-IV – изолят GU233454, обнаруженный в Австралии. Варианты подгруппы O-II были классифицированы по сходству генома в одну группу, тем не менее они имели значительную эволюционную дистанцию между друг другом. Так, изолят KZ11-PVS имеет только 97% гомологии с JX183954 или с AB364946 (Сирия) и FJ813514 (США). У членов подгруппы O-IV отсутствовала достаточная идентичность нуклеотидной последовательности (всего 98%) не позволившая сгруппировать их по алгоритмам программы MEGA-X. Многие казахские изоляты имели уникальные черты. Уникальный нуклеотид замены всех образцов не приводил к аминокислотным изменениям, за исключением изолятов «RL5»

ЛХ683388 (Колумбия) и «PVS-HU1» HF571059 (Венгрия). Так, вместо пролина был серин в первом случае, и аргинин вместо глицина во втором случае. Таким образом, сложно отследить пути проникновения вирусной инфекции PVS⁰ в Казахстан, однако, можно предположить, что эти изоляты вируса попали в Республику вместе с картофелем, предназначенным для употребления в пищу.

3.1.6 Диагностика различных штаммов PVS методом РОТ-мпПЦР

В связи с изменчивостью нуклеотидных последовательностей, нуклеотидный состав ранее подобранных праймеров для диагностики PVS не всегда позволял получить положительный ответ при проведении РОТ-мпПЦР на вирусы, выделенные в другом географическом регионе. Для успешной диагностики PVS была подобрана новая пара праймеров #PVS-new-Forward и #PVS-new-Reverse (Таблица 2.1), дающих фрагмент длиной 259 нт. Разницу между обычным и андским штаммом наблюдали при использовании трех праймеров #PVS-Forward, #PVS-new-Forward и #PVS-new-Reverse (Таблица 2.1), использованных в дуплексной или РОТ-мпПЦР (Рисунок 3.5, дорожки 9, 10, 13, 15-19, 22 и 23). Казахстанские изоляты KZ13-08-04 (дорожка 22) и KZ2-16i (дорожка 23) использовали в качестве образцов PVS^A; KZ11-PVS (13 дорожка), KZ5-11p (15 дорожка), KZ2-2i (16 дорожка) – как PVS⁰. Для PVS⁰ выделяют обе полосы 169 нт и 259 нт или только короткую наблюдались после дуплексной РОТ-ПЦР или мультиплексной реакции (дорожки 9, 10, 13, 15-19), в то время как для вариантов PVS^A была обнаружена только одна полоса размером 259 нт и слабый след около 169 нт обнаружены в обоих случаях (дорожки 22 и 23). Эти результаты подтвердили эффективность метода детекции вирусов картофеля с помощью РОТ-мпПЦР на основе специфических праймеров для обнаружения различных штаммов PVS в одностадийной реакции и были подтверждены еще на 64 образцах растений.

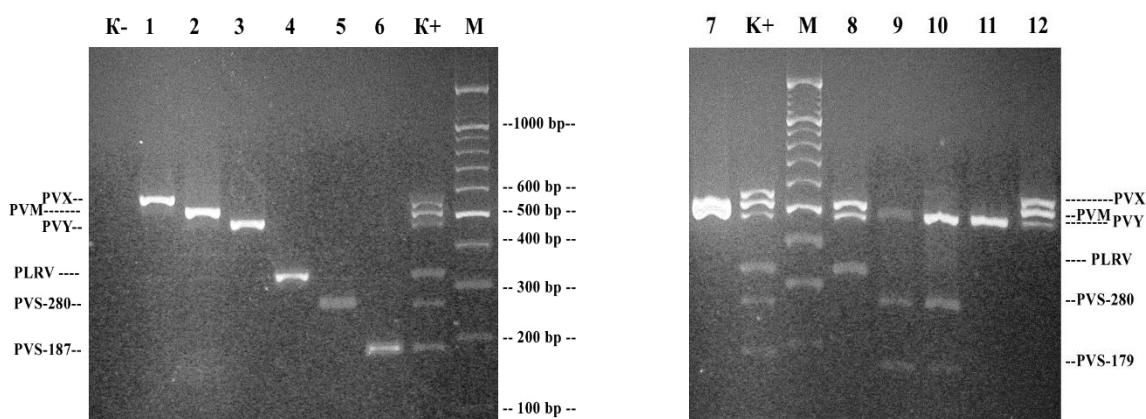


Рисунок 3.5, лист 1 – Электрофорез в 2% агарозном геле продуктов РОТ-мпПЦР листьев картофеля, инфицированного PVX, PVM, PVY, PLRV и PVS (экстракт тотальных РНК). Дорожки 1-6 – униплексная РОТ-ПЦР на PVX (дорожка 1), PVM (дорожка 2), PVY (дорожка 3), PLRV (дорожка 4), PVS (дорожки 5 и 6), «K-» – отрицательный контроль, «K+» – положительный

контроль, М – маркер (GeneRuler™ 100 нт), дорожки 7-12, 17-27 – РОТ-мпПЦР на PVX, PVM, PVY, PLRV и PVS, дорожки 13-16 – дуплексная РОТ-ПЦР на PVS. Положения маркерных полос располагали в центре, положения вирусоспецифических полос указывали справа или слева.

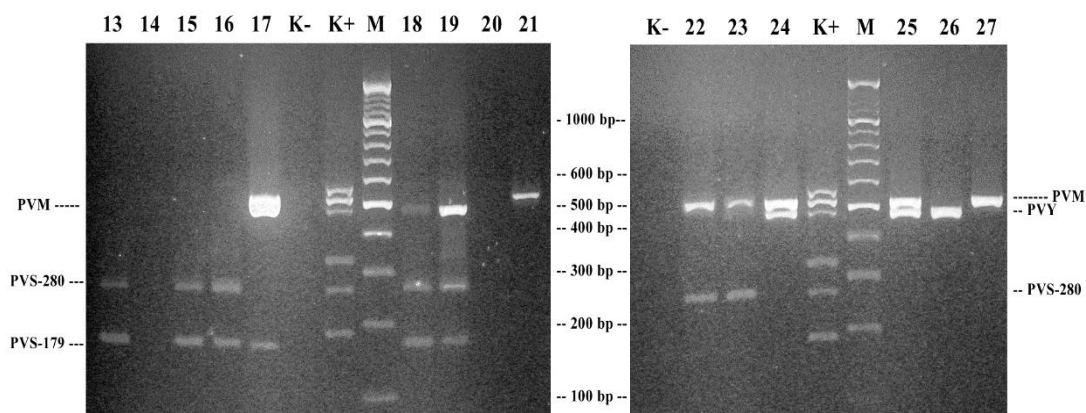


Рисунок 3.5, лист 2.

3.1.7 Секвенирование полных нуклеотидных последовательностей казахстанских изолятов, принадлежащих к двум разным штаммам PVS

Полные геномы двух изолятов «Fortune» и «Ushkonur», выделенные из растений, зараженных двумя штаммами PVS (по результатам РОТ-мпПЦР), были секвенированы методом перекрывающейся ПЦР. Нуклеотидные последовательности были депонированы в NCBI GenBank под номерами доступа МК442089 и MN095414, соответственно. После сравнительного анализа нуклеотидного состава с помощью NCBI BLAST, было установлено, что изолят «Fortune» имел 96% идентичность с «Qld1» (MF375506), относящийся к PVS^O, а «Ushkonur» на 99% с «BY» (MF033144) и «HB7» (KU896946), которые относят к PVS^A (Рисунок 3.6). Идентичность каждой последовательности с «Yunnan NN» или «RL5» соответственно составила 95%, а идентичность «Fortune» и «Ushkonur» достигла только 79%. Таким образом было установлено, что на территории Казахстана присутствуют оба штамма вируса PVS – PVS^O (Ordinary) и PVS^A (Andean).

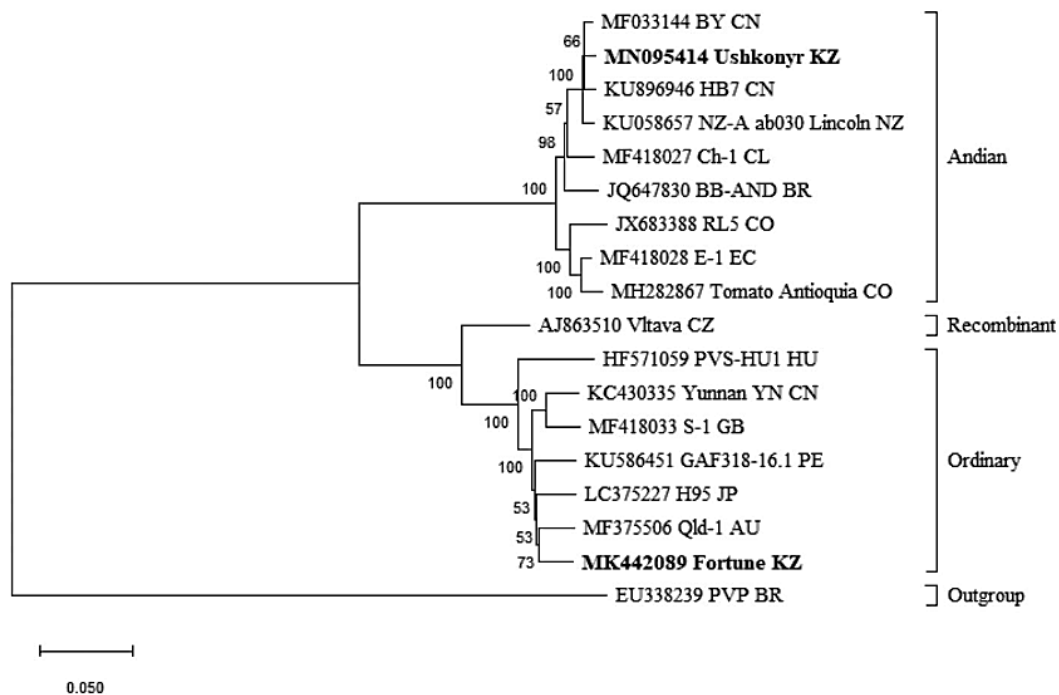


Рисунок 3.6 – Филогенетическое дерево, построенное по результатам сравнительного анализа полных нуклеотидных последовательностей 17 изолятов PVS, на основе алгоритмов метода Neighbor-Joining (MEGA-X). Значения начальной загрузки указаны в узлах ветвей филогении в процентах от 500 повторов. В качестве внешней группы (outgroup) использовали изолят *Potato virus P* (PVP). Казахстанские изоляты выделены **жирным** шрифтом. Номер доступа NCBI GenBank, название изолята и страна указаны для каждого генома [264].

3.2 Клонирование OPC2-OPC6 PVS в состав бинарного агробактериального вектора pBIN19

Оценка супрессионных свойств белков вирусов растений производится различными методами, наиболее известным из которых является метод транзientной (временной) экспрессии вирусного белка в системе *Nicotiana benthamiana* линии 16с [80]. Суть метода состоит в инокуляции листьев *N. benthamiana* 16с, стабильно экспрессирующего зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP) *Aequorea victoria*, смесью из двух линий агробактерий, одна из которых трансгенна по GFP (так называемый триггер РНК-интерференции), а другая – по интересующему белку, супрессорные свойства которого предполагается изучить. В результате временной трансформации в месте инокуляции происходит усиление свечения за счет повышенной экспрессии GFP в данном месте, которое обычно продолжается 3-4 дня после инокуляции, а затем полностью ликвидируется системой РНК-интерференции растения за счет нокдауна растительного гена *GFP* триггерной РНК. Если целевой белок обладает супрессионной активностью, место

инокуляции будет продолжать усиленно светиться под действием ультрафиолета (~490 нм).

Для оценки супрессорных свойств белков кодирующие последовательности открытых рамок считывания (ОРС) с 25К (ОРС2) по 11К (ОРС6) белков двух казахстанских изолятов вируса PVS «Fortune» и «Ushkonur» были клонированы в бинарный агробактериальный вектор pBIN19. Схематическое изображение всех ОРС на геномной РНК PVS приведено на Рисунке 3.7.



Рисунок 3.7 – Схематическое изображение организации генома PVS.

Плазмидный вектор pBI221 (NCBI GenBank Acc. No. AF502128), содержащий кодирующую последовательность *AtDREB1A*, был использован для клонирования кодирующих последовательностей ОРС PVS под контроль регуляторных элементов. Вектор pBI221 нес кодирующую последовательность β-глюкуронидазы (*uidA*) под контролем промотора 35S CaMV и терминатора гена нопалинсинтетазы (*nos*) (кассета [*35S CaMV-XbaI, BamHI – SalI, uidA – SstI – nos*]) между рестрикционными сайтами *HindIII* и *EcoRI*. Промежуточная рекомбинантная ДНК «pBI-*AtDREB1A*» была сконструирована ранее на основе pBI221 и содержала 5'-нетранслируемую последовательность (UTR) вируса табачной мозаики (TMV) между сайтами *BamHI* и *SalI*; и кодирующая последовательность гена *AtDREB1A*, клонированная между сайтами рестрикции *SalI* и *SstI* вместо гена *uidA* (Рисунок 3.8, А). Рекомбинантная ДНК «pBI221-*AtDREB1A*» была обработана рестриктазами *HindIII* и *EcoRI*. Короткий фрагмент, содержащий кассету [*HindIII-35S CaMV-XbaI, BamHI-AtDREB1A-SstI-nos-EcoRI*], повторно был клонирован в растительный плазмидный вектор pBIN19 (NCBI GenBank Acc. No. U09365).

Каждая кодирующая последовательность ОРС2-ОРС6, в виде амплифицированного фрагмента (праймеры для амплификации указаны в Материалах и методах), была повторно клонирована между сайтами *SalI* (для всех фрагментов) и *Acc65I* (для ОРС3, ОРС4 и ОРС6), *SacI* (для ОРС2) или *BglIII* (для ОРС5) (см. Рисунок 3.8). Отбор рекомбинантных ДНК проводили с помощью ПЦР с участием пары специфичных праймеров и рестрикционного анализа с участием гидролаз, использованных для клонирования. Таким образом, для изолятов «Fortune» и «Ushkonur» были получены рекомбинантные ДНК, содержащие кодирующие последовательности каждой из ОРС2-ОРС6 под контролем промотора 35S CaMV, 5'-TMV и *nos*-терминатора.

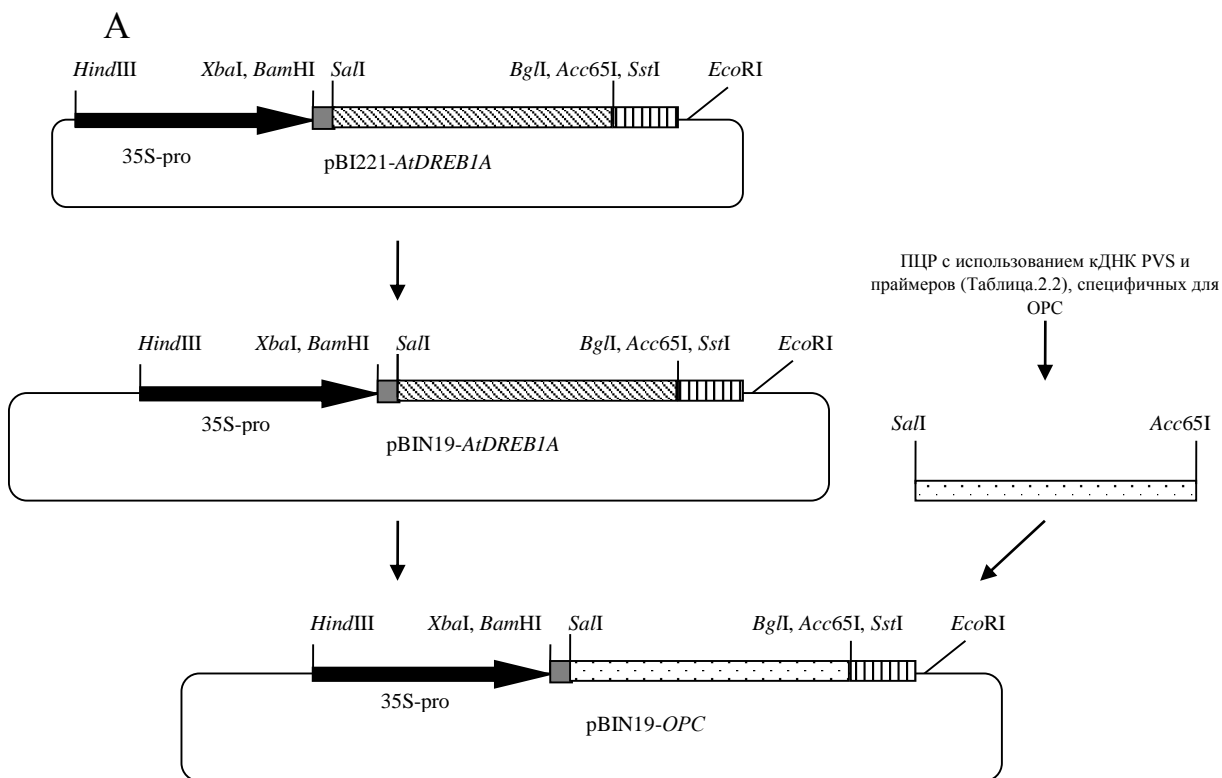


Рисунок 3.8, лист 1 – Схема, клонирования различных OPC PVS в состав плазмид pBI221 (Б) [265] и pBIN19 (В) [266]. Промотор 35S CaMV показан черной стрелкой, 5'-TMV – серым прямоугольником, кодирующая последовательность AtDREB1A – прямоугольником с косыми линиями, nos-терминатор – прямоугольником с вертикальными линиями, кодирующая

последовательность ОРС – прямоугольником с точками, а плазмиды pBI221 или pBIN19 – овалы.

В

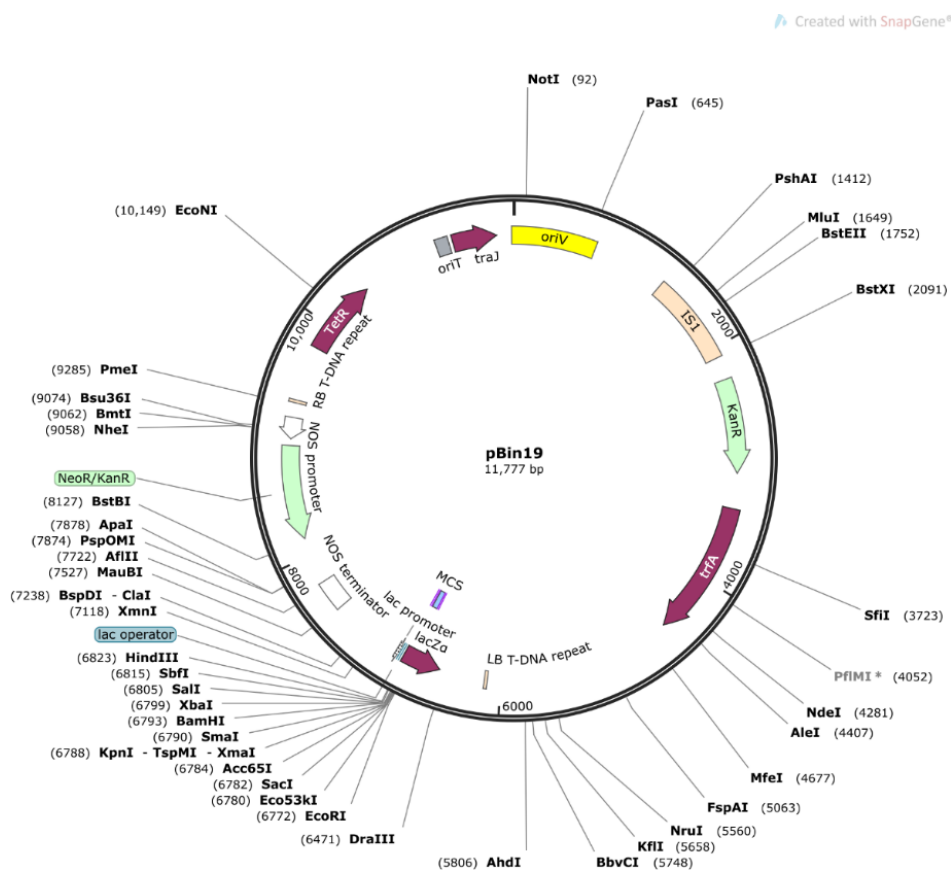


Рисунок 3.8, лист 2.

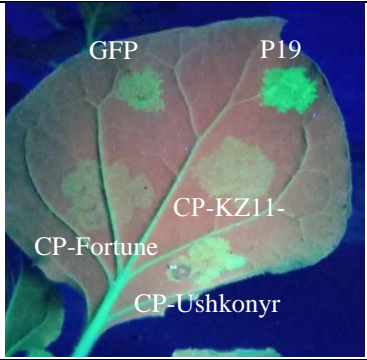
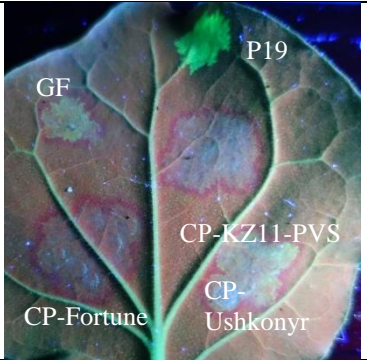
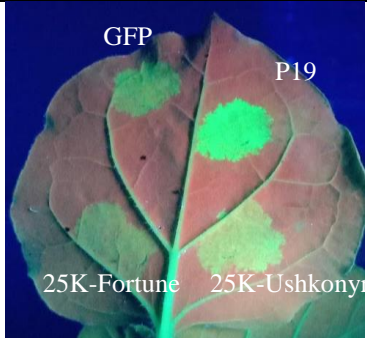
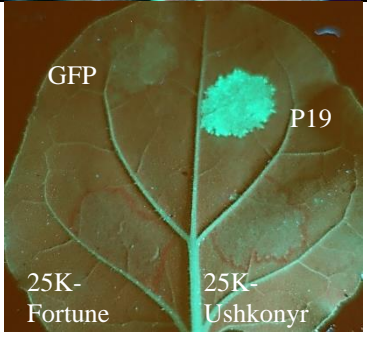
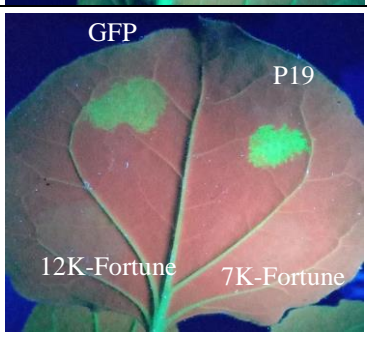
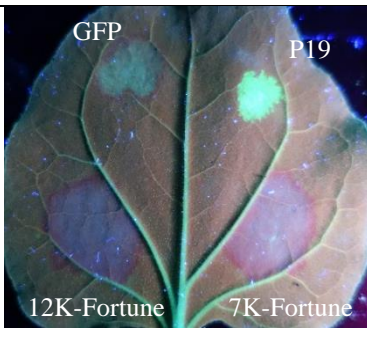
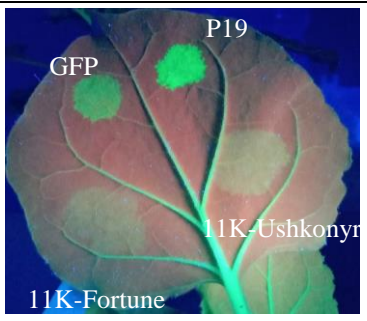
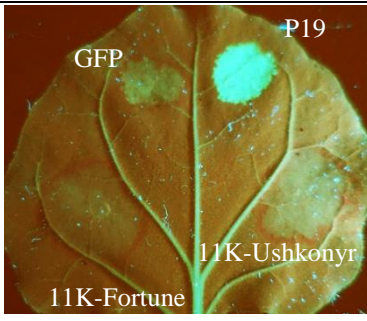
Полученные рекомбинантные ДНК были использованы для трансформации агробактерий и последующей транзientной экспрессии белков ОРС2-ОРС6 изолятов «Fortune» и «Ushkonуr» в системе *N. benthamiana* 16с.

3.2.1 Транзientная экспрессия ОРС2-ОРС6 двух казахстанских изолятов PVS в системе *Nicotiana benthamiana* 16с

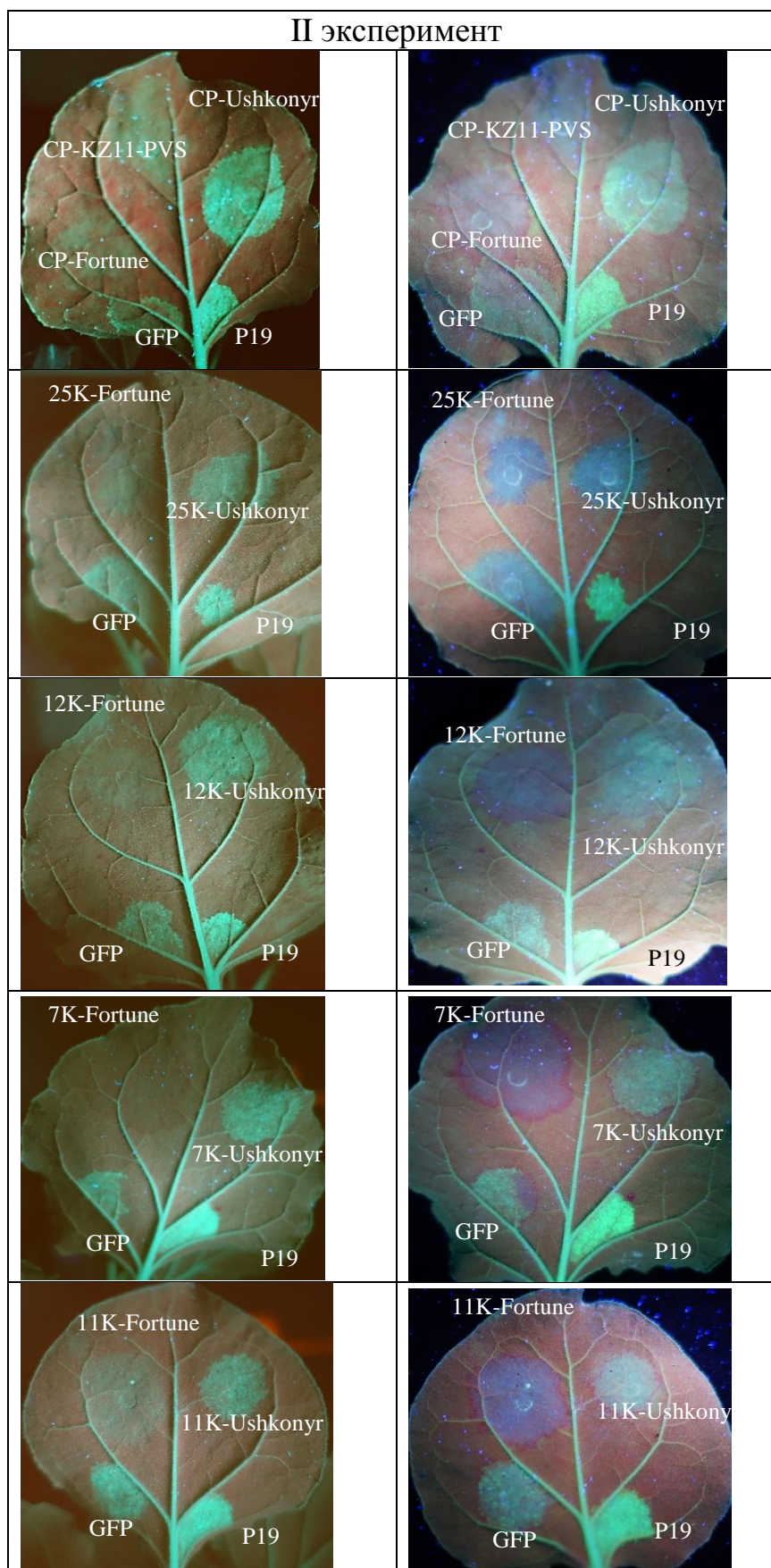
Линии агробактерий, полученные в результате трансформации рекомбинантными ДНК, кодирующими ОРС2-ОРС6 изолятов «Fortune» и «Ushkonуr» в смеси с триггером РНКи использовались для инфильтрации листовых дисков *N. benthamiana* 16с. Помимо опытной смеси агробактерий, каждый листовой диск был инфильтрирован также двумя контрольными смесями трансгенных агробактерий: в качестве положительного контроля использовались вектора, несущие в своем составе кодирующие последовательности известных супрессоров РНКи – белок Р19 вируса *Tomato bushy stunt virus* или хелперный компонент протеазы НС-Pro вируса РVУ. В качестве отрицательного контроля был использован только триггер РНКи – вектор, кодирующий GFP. Результаты транзientной экспрессии оценивались под ультрафиолетовой лампой (490 нм) на 3-й и 7-ой дни после инфильтрации

(Таблица 3.2). Положительный и отрицательный контроли использовались для сравнения степени свечения инокулированных участков листовой пластины табака.

Таблица 3.2 – Результаты транзientной экспрессии кодирующих нуклеотидных последовательностей OPC2-OPC6 изолятов «Fortune» и «Ushkonyr» на 3-й и 7-ой дни после инфильтрации листовых дисков *N. benthamiana* 16с. В качестве контролей использованы: К+ P19 TBSV, К- GFP.

3 дня после инфильтрации (д.п.и.)	7 дней после инфильтрации (д.п.и.)
I эксперимент	
	
	
	
	

Продолжение Таблицы 3.2



Была проведена серия экспериментов (результаты I и II экспериментов приведены в Таблице 3.2) в которой проводилась оценка возможных супрессорных свойств белков, кодируемых OPC2-OPC6 двух казахстанских изолятов PVS «Fortune» и «Ushkonyr». Усиление свечения листовых дисков в местах инокуляции наблюдалось для всех проб, однако не превышало уровня отрицательного контроля (GFP), в месте использования положительного контроля (P19) было обнаружено интенсивное свечение на протяжении всего эксперимента (7 д.п.и.). По результатам I-го эксперимента можно утверждать, что супрессорных свойств белки, кодируемые OPC2-OPC6 обоих штаммов ни на 3-й, ни на 7-ой день не проявляли, в том числе не обнаружено различия между двумя штаммами.

Результаты II-го эксперимента несколько отличались: все пять белков, кодируемых OPC изолята «Ushkonyr» поддерживали свечение в местах инокуляции и на 3-й и на 7-ой день, однако интенсивность свечения была на уровне отрицательного контроля (GFP). В то время как белки, кодируемые OPC2-OPC6 изолята «Fortune» теряли свечение уже на 3-й день, а на 7-ой наблюдалась полное блокирование свечения, даже по сравнению с контролем.

Повторное проведение экспериментов по инокуляции листовых дисков табака *N. benthamiana* 16с суспензией трансгенных агробактерий подтвердило результаты второго эксперимента. Для молекулярного подтверждения супрессионных свойств был проведен northern-блот анализ тотальных РНК на присутствие киРНК GFP, что свидетельствовало бы о том, что анализируемые белки могут подавлять РНКи.

3.2.2 Молекулярная диагностика супрессионной активности белков CP и 25K двух казахстанских изолятов PVS с помощью northern-блот анализа

Согласно литературным данным, два белка карлавирусов 25K и 11K являются кандидатами на проявление супрессионных свойств [267], также была обнаружена супрессионная активность CP-белка карлавируса PVM [268].

Места инокуляции листа трансгенными агробактериями, несущими в своем составе кодирующие последовательности OPC белков оболочки и 25K белков двух казахстанских изолятов PVS «Fortune» и «Ushkonyr», относящихся к разным штаммам, были вырезаны и использованы для выделения тотальных РНК и последующего проведения northern-блота для молекулярной диагностики на присутствие киРНК GFP, что подтверждало бы наличие супрессорных свойств у тестируемых белков. После разделения в денатурирующем 15% ПААГ, содержащем 7 М мочевины, РНК была перенесена на нейлоновую мембрану и произведена гибридизация с зондом к GFP, меченным UTP³² (Рисунок 3.9).

В результате гибридизации с радиоактивно-меченой пробой было обнаружено, что во всех образцах, кроме не инокулированного суспензией агробактерий (Mock), детектировались киРНК GFP, размером 21, 22 и 24 нт, образованные в результате временной экспрессии триггера, что соответствовало ожидаемому. Ни в одном из опытных образцов не наблюдалось накопление киРНК, что, однако, не свидетельствовало о наличии супрессионных свойств белков CP и 25K обоих изолятов. Усиление сигнала киРНК на уровне 21-24 нт

косвенно указывает на возможное проявление супрессионных свойств тестируемого белка (P19), однако, в то же время, наблюдался эффект усиления свечения в местах инокуляции растений *N. benthamiana* 16с. Поскольку усиления свечения выше отрицательного контроля в инокулированных местах не наблюдалось, можно сделать вывод об отсутствии супрессионных свойств у CP и 25K белков обоих изолятов. Однако, по результатам northern-блота наблюдались различия между 25K белками двух штаммов – в варианте 25K-Fortune обнаружен очень слабый ответ по сравнению с 25K-Ushkonуr. В то же время, CP-белки обоих изолятов проявили примерно равный ответ при гибридизации. Таким образом, 25K белок являлся наиболее вероятным кандидатом на роль супрессора РНКи вируса PVS.

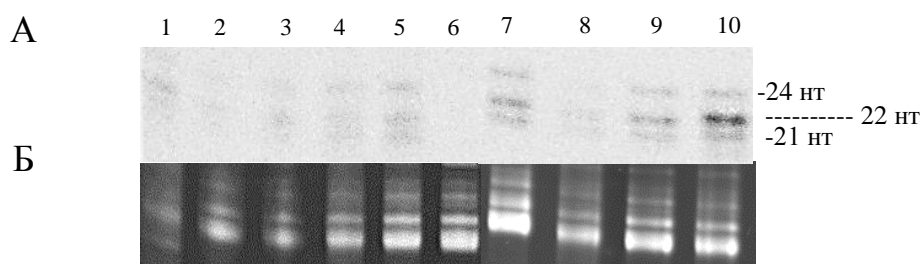


Рисунок 3.9 – Результаты northern-блот анализа тотальных РНК *N. benthamiana* 16с, выделенных на 7-ой день после инфильтрации листовых дисков культурой агробактерий. 1 – CP-KZ11-PVS, 2 – CP-Fortune, 3 – CP-Ushkonуr, 4 – P19 TBSV, 5 – GFP, 6 – Mock (фрагмент листового диска без инокуляции суспензией агробактерий), 7 – 25K-Ushkonуr, 8 – 25K-Fortune, 9 – GFP, 10 – HC-Pro PVY. А – Результаты гибридизации киРНК табака с зондом к GFP-UTP³², Б – электрофореграмма результатов разделения тотальных РНК в денатурирующем 15% ПААГ, после окрашивания в бромиде этидия.

В одном из положительных контролей “HC-Pro PVY” доминировали киРНК, размером 22 нт, а киРНК размером 21 и 24 нт были примерно в одинаковых количествах. В другом положительном контроле “P19 TBSV” не наблюдалось увеличение количества киРНК GFP относительно отрицательного контрольного образца. Отсутствие доминирующих киРНК в данном случае свидетельствовало о различных механизмах супрессии РНКи между P19 и HC-Pro (Рисунок 3.10). В первом случае, супрессор взаимодействует с миРНК на промежуточном уровне, включая миРНК метиляцию [269, 270]. Во втором случае супрессор связывается с 21-22 нт киРНК соответствующими вирусной последовательности [271]. Таким образом, HC-Pro действует на более ранней стадии механизма РНКи, чем P19 (Рисунок 3.10), и при выделении тотальных РНК возможно разделение фракции связанных киРНК от белка HC-Pro.

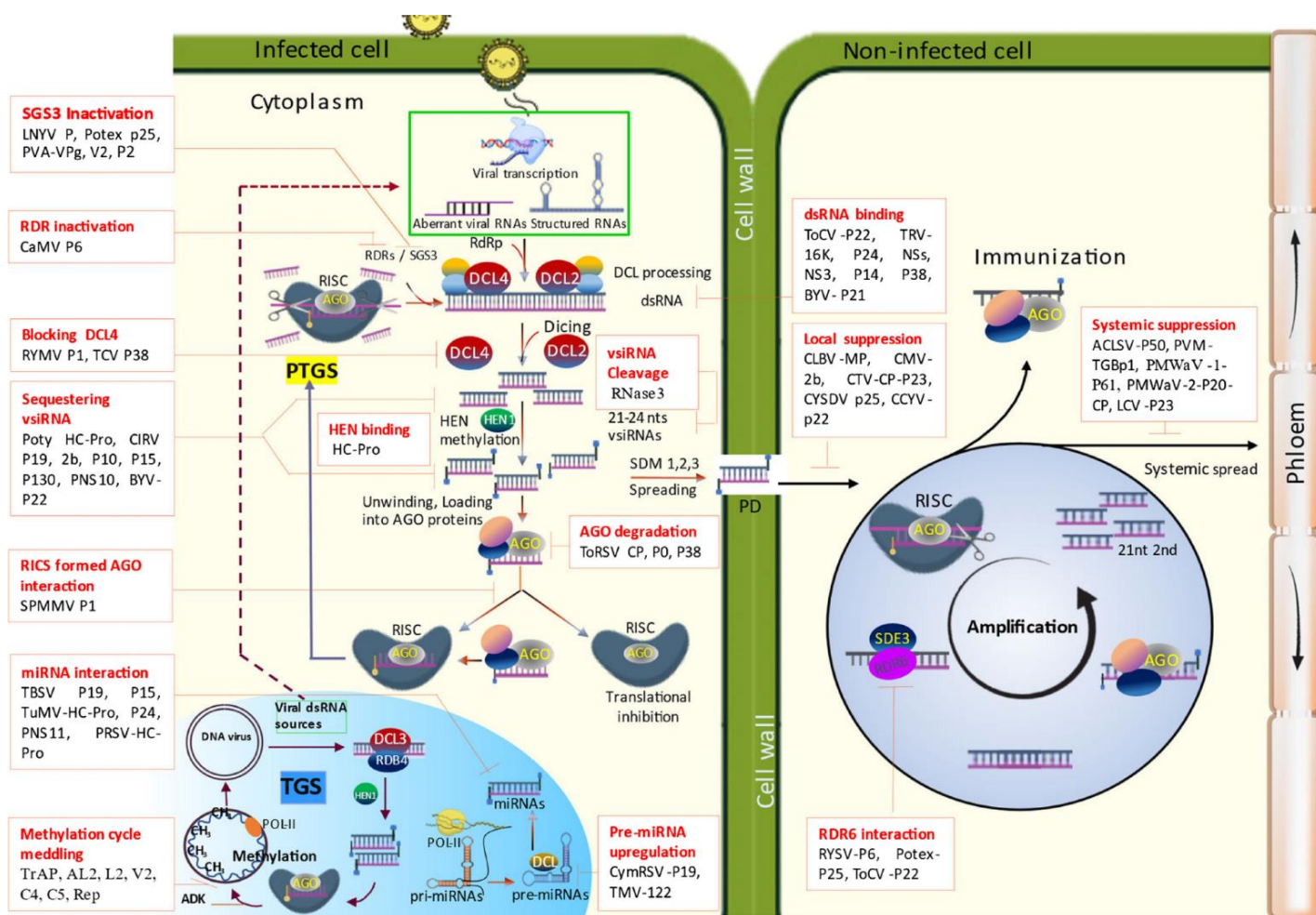


Рисунок 3.10 – Схематическое изображение влияния различных вирусных супрессоров на механизм РНКи с указанием этапов, на которых происходит блокирование процесса [272].

В результате проведенных опытов по идентификации белков-супрессоров РНКи вируса PVS, установлено, что белки, кодируемые OPC2-OPC6, не проявляли выраженных супрессионных свойств либо обладали слабой супрессионной активностью на грани возможной регистрации. Однако, опубликованные ранее работы, свидетельствуют, что даже близкородственные виды вирусов часто обладают различными путями и механизмами супрессии РНКи [272]. Так, например, Senshu с соавт. показали, что уровень супрессионной активности 25K белка пяти различных вирусов, относящихся к роду *Potexvirus* (группа вирусов, сходных по организации генома с карлавирусами и относящихся к семейству *Alphaflexiviridae*), варьировал [273], причем супрессионная активность опытного белка была подтверждена только у трех из пяти вирусов.

Таким образом, сильного супрессора РНКи у вируса PVS установить не удалось, однако выявленная при этом разница между супрессионной активностью белков двух штаммов PVS подтвердила большую вирулентность андского штамма PVS^A, по сравнению с обычным штаммом PVS^O. Полученные

результаты поиска супрессорных белков вируса PVS не говорят об отсутствии активности в подавлении РНКи у этих белков, возможно, метод транзientной экспрессии в системе *N. benthamiana* 16с не подходит для поиска супрессоров с низкой активностью.

Одним из возможных объяснений полученных результатов является тот факт, что вирус PVS встречается в виде одиночной инфекции крайне редко (примерно 1% от комплексной вирусной инфекции с участием PVS) (см. п. 3.1.1). Чаще всего этот вирус присутствует совместно с вирусами PVM и/или PVX, относящимся к семейству вирусов *Flexiviridae*. Как уже отмечалось ранее, карлавирусы (PVS и PVM) и потексвирусы (PVX) имеют сходную организацию генома (см. Рисунок 3.2). У вирусов PVM и PVX доказана супрессионная активность белков оболочки, 25К и 11К [220]. Можно предположить, что вирус PVS для своего размножения в зараженном растении использует свойство синергизма с родственными вирусами, и, таким образом, пользуется белками супрессорами вируса-партнера.

Еще одним возможным объяснением отсутствия сильного супрессора РНКи является тот факт, что у вируса PVS имеется 5'-нетранслируемый регион перед кодирующей частью ORC1, проявляющий энхансерные свойства [274]. Таким образом, за счет более активного связывания рибосом клетки хозяина у этого вируса нет необходимости в сильном белке супрессоре, подавляющем РНКи клетки хозяина.

Поскольку, наиболее вероятными кандидатами на роль супрессора РНКи PVS являются белок оболочки и 25К, было решено использовать кодирующие последовательности этих протеинов для создания рекомбинантных ДНК и последующей стабильной трансформации растений картофеля для оценки способности этих двух последовательностей к инициации механизма РНКи и последующей защиты растений от заражения вирусной инфекцией.

3.3 Получение картофеля, устойчивого к карлавирусам

3.3.1 Создание рекомбинантных ДНК для стабильной трансформации и получения вирус-резистентных растений картофеля

Исторически, трансген-индуцированная резистентность растений к вирусу *Tobacco mosaic virus* (TMV) была получена на табаке с использованием кодирующей последовательности CP-белка вируса в качестве трансгена [224]. Затем было получено множество сельскохозяйственных культур, устойчивых к поражению вирусным инфекциям, за счет использования фрагмента вирусной последовательности в составе трансгена [275, 276]. Использование инвертированных повторов фрагментов нуклеотидных последовательностей вируса/вирусов, разделенных растительным интроном (так называемые шпилечные рекомбинантные ДНК) для трансформации растений, показало свою эффективность за счет образования дцРНК в результате сплайсинга [76, 277]. При этом, дцРНК сразу подвергаются процессингу посредством DICER-подобных белков и включаются в состав RISK-комплекса, обеспечивающего запуск аппарата РНКи. Таким образом, использование инвертированных повторов нуклеотидных последовательностей вирусов является эффективной

методикой получения устойчивых растений во всем мире.

Для получения картофеля, устойчивого к вирусу PVS, было решено создать четыре варианта трансгенных конструкций, содержащих инвертированные повторы кодирующих последовательностей CP и 25K белка вируса в прямой и обратной ориентациях. Для клонирования рекомбинатных ДНК был проведен компьютерный анализ последовательностей CP и 25K белка доступных изолятов вируса с целью установления наличия сайтов рестрикции и разработки схемы клонирования.

Геномная последовательность кодирующей области CP-белка PVS изолята “Yunnan YN” KC430335, занимает положения с 7216 по 8100 нт и имеет следующий нуклеотидный состав (инициаторный и стоп-кодон выделены **жирным** шрифтом, присутствующие сайты рестрикции *Bam*HI и *Sac*I подчеркнуты):

```
7201 tgtccacacag agaaaatgcc gcccaaaccg gatccgacga gctcaggaga ggcaccacaa
7261 gctataccac ttgcccacc gccccggaac gtagaggagc atagagttgg cccaagtcaa
7321 gggcacgggc agaatgaaga ggctatgctg gagcagaggc tcatcagatt gattgaactc
7381 atggcctcga aaaggcaciaa ttcaacattg agcaacatct cttttgagat aggtcggccc
7441 tgccttgagc cgacccatga aatgcccagg aatcccggaga acccatactc gcggttttca
7501 atcgatgagc tgtttaagat ggaaatccga tctgtgtcca acaacatggc gaacaccgag
7561 caaatggcac aaatcactgc tgacatcgct ggactcgggg tccccactga acacgttgca
7621 ggggtcatac tgaaagtggg gatcatgtgt gcaagcgtga gtagctctgt ttatctggac
7681 ccggcagggg ctgtggagtt cccaacaggc gcagtgcccc tggactcgat cattgcaatc
7741 atgaagaatc ggcgaggatt gagaaaagtg tgcaggctgt acgctccagt cgtgtggaat
7801 tacatgctag tacagaatag gccaccttcg gattggcagg ccatgggatt tcaatggaat
7861 gcacgcttca ccgcatttga cacattcgat tatgtgacta atggggctgc aatccagccc
7921 gtagaggggc tcatacgcag gccacgcctt gaggaaacaa tagctcaciaa tgcccaciaa
7981 agtatggcaa ttgacaagtc gaacagaaat gagcagattgg ccaacactaa tgttgagtac
8041 actggaggga tgcttggcgc tgagattgtg cgcaatcacc gtaatgcgat caaccaattga
```

Для клонирования этой последовательности были подобраны праймеры #302 (*Xba*I), #303 (*Sma*I), #304 (*Bgl*II) и #305 (*Sal*I), последовательности праймеров содержали сайты рестрикции, удобные для последующего клонирования. Эти последовательности подчеркнуты, а наименования рестриктаз указаны в скобках (Таблица 2.3).

Для выделения гРНК PVS были использованы листья растений картофеля, полученные с поля и показавшие положительный ответ при ИФА-диагностике с антителами к белку оболочки данного вируса. С участием выделенных препаратов тотальных РНК была проведена реакция обратной транскрипции и сопряженной полимеразной реакции. В реакции использовали олигонуклеотиды #302 и #304 для получения смысловой копии или #303 и #305 для получения антисмысловой копии фрагмента кодирующей области CP-белка PVS. Результаты электрофореза продуктов реакции представлены на Рисунке 3.11.

Согласно рисунку из четырех вариантов образцов только варианты РНК 1 (соответствующая образцу KZ1-10i) и РНК 3 (соответствующая образцу KZ11-PVS) позволяли амплифицировать ДНК-фрагменты ожидаемого размера (около 750 нт для белка 25K и около 900 нт для CP-белка).

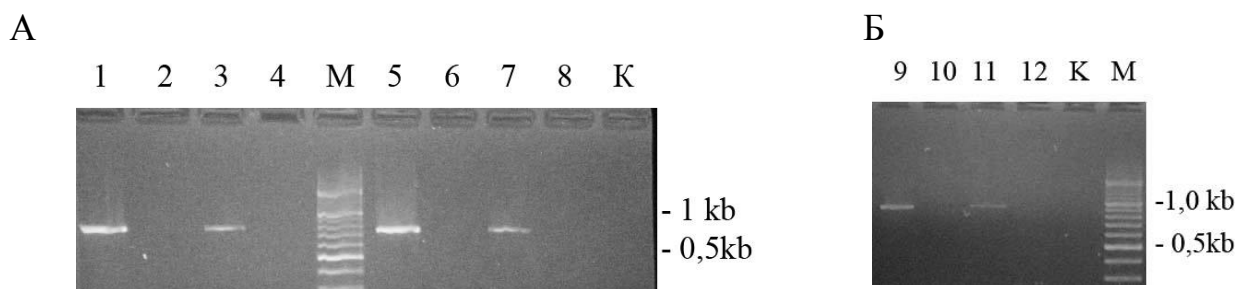


Рисунок 3.11 – Результаты электрофореза продуктов РОТ-ПЦР с участием тотальных РНК, проведенной с целью синтеза ДНК-фрагментов, содержащих последовательности белка 25К (А) и СР-белка (Б). Реакция проводилась с образцами тотальных РНК четырех видов с участием праймеров #306 и #308 (дорожки 1-4), #307 и #309 (дорожки 5-8), #302 и #304 (дорожки 9-10), #303 и #305 (дорожки 11-12); 1, 5, 9 и 11 – образец РНК №1; 2, 6 и 10 – образец РНК №2; 3 и 7 – образец РНК №3, 4 и 8 – образец РНК №4, К – отрицательный контроль реакции, М – маркеры “Fermentas” (100 нт).

Кодирующая последовательность белка 25К PVS того же изолята занимает положения с 5965 по 6706 нт и имеет следующий нуклеотидный состав (инициаторный и стоп-кодон выделены **жирным** шрифтом, присутствующий сайт рестрикции *XbaI* подчеркнут):

```

5941 aagcatttgc tgaagtctga gatccgctgt gtgatgagg atatttgata gcttaggtaa
6001 tcagccttagt agtattgaat atatggatgt gtttttgcaa attttgaaata aatataaatt
6061 tgagcgtggt agtagtactt taaataaacc aatagttggt catagtgctc cgggagctgg
6121 taaaagttct gcaatccggg agttacttaa gttagatagt aggtttgagt gcattaccgc
6181 tggccggcca gacatcccga atctagaggg ggcttttatt aaggctgagc gcagtgggga
6241 ggataaattg ctgctgggtg atgagtacat agaagggccg gtcccagagg acgcctttgc
6301 aatctttgca gatccacttc agagcaccgc tgcgagccca taccgagcgc acttcatcaa
6361 aacattgagc catcgtttcg gcgagtgtac cgcttccctt ttgagagatt tgggctggga
6421 cgtacaggca gaaggtcaag attcagttca aatcgcagat atcttcacag ttgaccctag
6481 ggatactatt gtgtacttcg aaccagaagt tggggagtta ctgaggagcc acggagtcga
6541 ggcgagctgc attggtgagg tgcgcggggc tactttcgaa cacgtgacct tcgtcacttc
6601 tgagaacggc ccactggttg ataaagctgc cgcttttcaa tgcttaacga ggcacactaa
6661 gagcttgctc atattgtgcc ctgatgccac ttacaccgcc gccttaactac acagggttat

```

Для клонирования данной последовательности были использованы праймеры #306 (*NcoI*), #307 (*SacI*), #308 (*BamHI*) и #309 (*SalI*). С помощью праймеров #306 и #308 был амплифицирован ДНК-фрагмент, содержащий смысловую последовательность белка 25К PVS, а с помощью праймеров #307 и #309 – ДНК-фрагмент, содержащий антисмысловую последовательность кодирующей области этого белка (Рисунок 3.11, А). ПЦР-продукты были получены, как и в случае с белком оболочки, только тогда, когда реакция была проведена с участием образцов РНК №1 и №3. Согласно рисунку размер фрагмента составлял около 750 нт, что совпадало с расчетным показателем (731 нт).

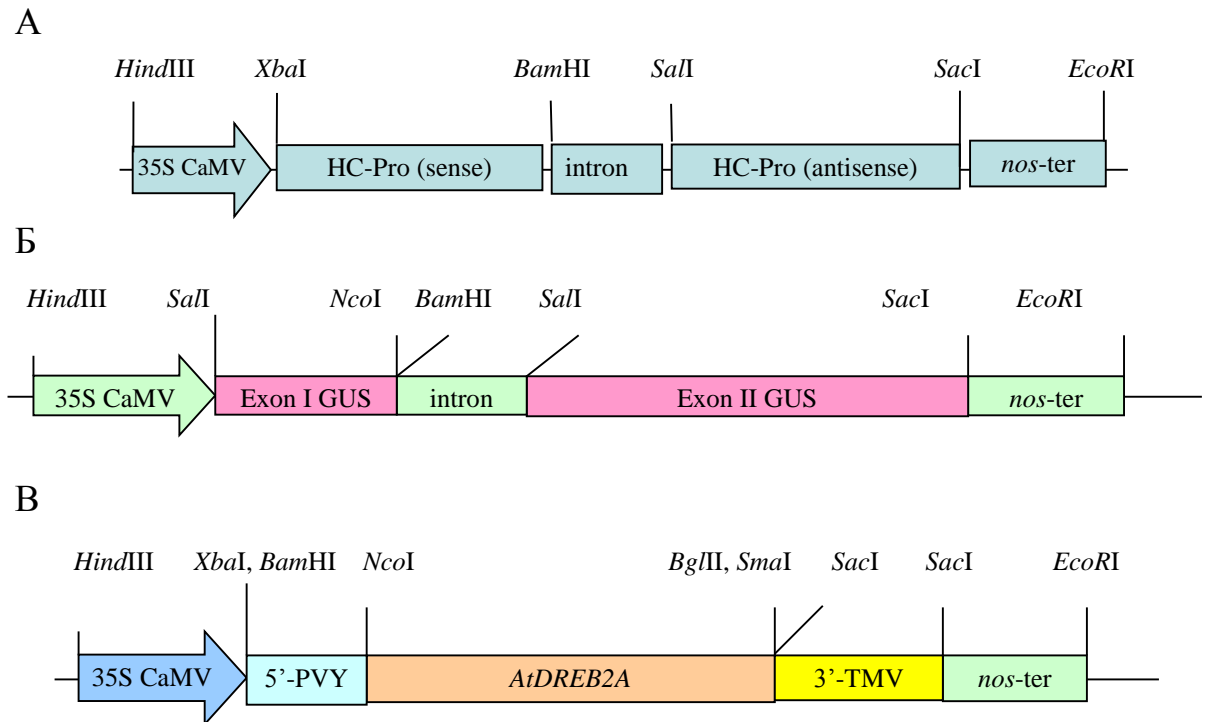


Рисунок 3.13 – Схематичное представление исходной рекомбинантной кассеты (А), а также вспомогательных рекомбинантных ДНК, использованных для клонирования фрагментов гРНК PVS (Б и В). А – Схема кассеты, расположенной между сайтами рестрикции *Hind*III и *Eco*RI в теле pCAMBIA2300. Последовательность HC-Pro PVY в смысловой (HC-Pro (sense)) и антисмысловой ориентации (HC-Pro (antisense)) расположена с 5'- и 3'-конца интрона I гена каталазы *cat1* (intron) под контролем промотора 35S CaMV и *nos*-терминатора. Б – Вспомогательная рекомбинантная ДНК «HYPO-GUS», содержащая изображенную ДНК-кассету в составе плазмидного вектора pBluescript KS+. В – Вспомогательная рекомбинантная ДНК «AtDR2A», содержащая изображенную ДНК-кассету в составе плазмидного вектора pUC19 («5'-PVY» - 5'-UTR Y вируса картофеля).

После проведения трансформации *E. coli* DH5 α полученными ДНК-конструкциями, клетки были высажены на среду с селективным антибиотиком канамицином. Из ночной культуры клонов были выделены препараты плазмидных ДНК. Отбор нужного варианта ДНК проводился с помощью ПЦР и рестрикционного анализа с участием *Xba*I и *Sal*I. В результате анализа продуктов этих двух реакций с помощью электрофореза в агарозном геле было показано, что ДНК №3 и №12 содержат последовательность белка оболочки. Согласно Рисунку 3.14 у этих вариантов ДНК в результате ПЦР происходит синтез фрагмента размером около 900 нт, а в ходе реакции рестрикции образуется

мелкий фрагмент размером около 1100 нт в отличие от фрагмента размером около 750 нт у исходного варианта.

Параллельно было проведено клонирование антисмыслового фрагмента СР-белка в исходную ДНК, представленную на Рисунке 3.13, А, по сайтам рестрикции *SalI* и *Ecl136II* (*Ecl136II* является изошизомером рестриктазы *SacI* и распознает тот же сайт, но вместо липких концов после гидролиза *Ecl136II* образуются тупые концы).

Исходная ДНК была обработана указанными выше рестриктазами для получения тяжелого фрагмента. Для получения легкого фрагмента проводился гидролиз ДНК-фрагмента, синтезированного с помощью ПЦР с участием праймеров #303 и #305 и содержащего антисмысловую ориентацию СР-белка, с участием рестриктаз *SalI* и *SmaI*. Тяжелый и легкий фрагменты были очищены и использованы в реакции лигирования №2.

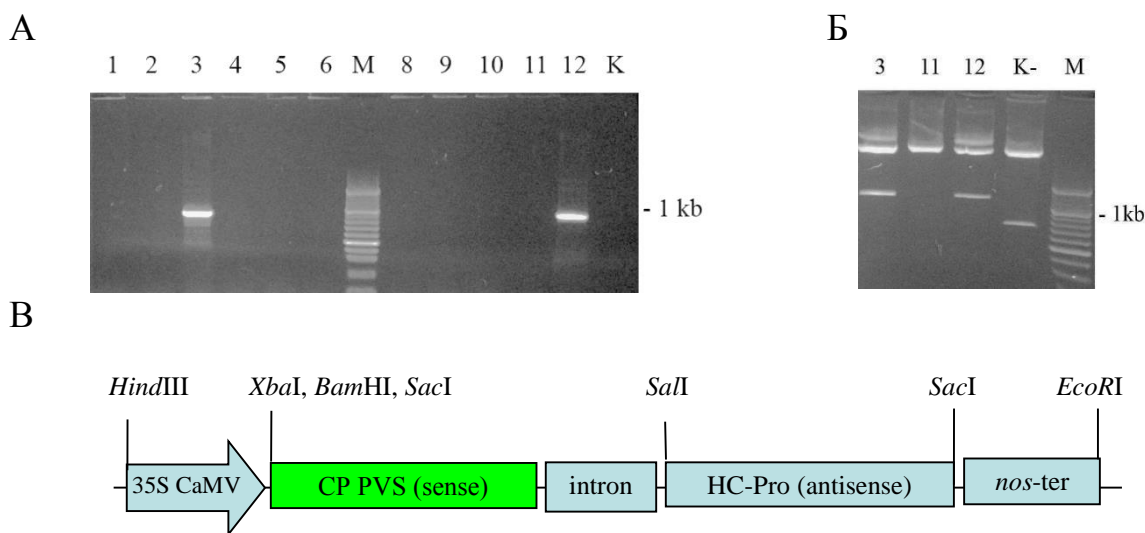


Рисунок 3.14 – Результаты клонирования смыслового фрагмента белка PVS. А – Результаты электрофореза в агарозном геле продуктов ПЦР с участием праймеров #302 и #304 (А). Б – Результаты электрофореза продуктов рестрикционного анализа с участием рестриктаз *XbaI* и *SalI* (1-12 – варианты анализируемых ДНК, М – маркеры (100 нт от «Fermentas»), К – отрицательный контроль), В - схема полученной рекомбинантной кассеты ДНК №3 (или ДНК №12).

В ходе лигирования восстанавливался сайт рестрикции *SalI* на 5'-конце клонируемого фрагмента, но уничтожались сайты *SmaI* и *Ecl136II* (а, следовательно, и *SacI*) на его 3'-конце. Лигирующей смесью №2 были трансформированы клетки *E. coli*. Отбор клонов проводился по той же схеме с помощью ПЦР-анализа и гидролиза рестриктазами *SalI* и *EcoRI*. В результате была получена ДНК №4, содержащая антисмысловый фрагмент кодирующей области СР-белка PVS (Рисунок 3.15).

На третьем этапе клонирования ДНК № 3 и ДНК №4 были обработаны рестриктазами *HindIII* и *SalI* для получения легкого и тяжелого фрагментов соответственно. Фрагменты были очищены и была проведена реакция лигирования №3 с их участием. В результате были получены ДНК №2 и №5, у которых оба рестрикционных сайта восстанавливались, образуя кассету, содержащую кодирующую последовательность СР-белка в обеих ориентациях (Рисунок 3.16, А, Д).

С помощью рестрикции с участием эндонуклеаз *HindIII*, *XbaI*, *NcoI*, *BamHI*, *SalI*, *SacI*, *EcoRI* и их комбинаций был проведен анализ на присутствие указанных сайтов гидролиза внутри полученной рекомбинантной ДНК-кассеты. В результате электрофореза в 1,2%-ном агарозном геле продуктов гидролиза было показано, что построение ДНК-кассеты соответствует ожидаемому варианту (Рисунок 3.16, В). Кроме того, был проведен ПЦР-анализ на присутствие нуклеотидных последовательностей всех компонентов ДНК-кассеты (Рисунок 3.16, Г).

После реакции секвенирования с участием одиночных праймеров, подобранных к 5'- или 3'-концу интрона I гена *cat1*, а также к 5'-концу *nos-терминатора*, проведен анализ ориентаций последовательностей генов СР-белка в созданной ДНК-кассете. После реакции секвенирования и последующего компьютерного анализа было показано, что кодирующая последовательность СР-белка присутствует в смысловой или антисмысловой ориентациях.

В ходе дальнейшего анализа с помощью программы Blast NCBI GenBank было установлено: нуклеотидные последовательности фрагментов гРНК PVS идентичны на 98-99% соответствующей последовательности СР-белка штамма "Yunnan YN".

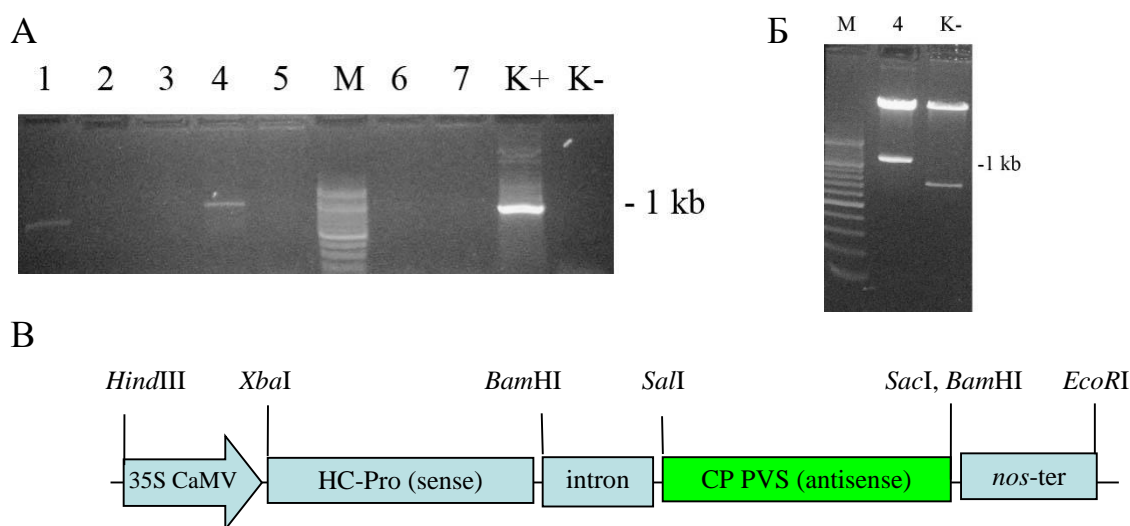


Рисунок 3.15 – Результаты клонирования антисмыслового фрагмента СР-белка PVS. А – Результаты электрофореза в агарозном геле продуктов ПЦР с участием плазмидных ДНК и праймеров #303 и #305 (А), Б – Результаты электрофореза продуктов рестрикционного анализа плазмидной ДНК №4 с участием рестриктаз *SalI* и *EcoRI* (1-7 – варианты анализируемых ДНК, М –

маркеры (100 нт от «Fermentas», К – отрицательный контроль), В - схема полученной рекомбинантной кассеты ДНК №4, обозначения остальных компонентов кассеты указаны на Рисунке 3.13.

Таким образом, в результате клонирования была создана рекомбинантная ДНК «S-CP-AS», несущая кодирующую последовательность CP-белка в смысловой и антисмысловой ориентациях на 5'- и 3'- концах последовательности интрона под контролем промотора 35S CaMV и *nos*-терминатора (Рисунок 3.16, Д).

Согласно вышеуказанной схеме клонирования была получена следующая ДНК-кассета, несущая кодирующую последовательность CP-белка PVS в антисмысловой и смысловой ориентациях на 5'- и 3'-концах интрона под контролем промотора 35S CaMV и *nos*-терминатора «AS-CP-S», с той лишь разницей, что ПЦР-продукты, содержащие кодирующую последовательность CP-белка, синтезировали с помощью праймеров #711, #712, #713 и #714. В результате была получена рекомбинантная ДНК, схематично изображенная на Рисунке 3.16, Е.

Кодирующая последовательность 25К белка содержала внутри сайт рестрикции *Xba*I. Поэтому схема клонирования смыслового и антисмыслового ПЦР-продуктов, содержащих нуклеотидные последовательности этого белка, отличалась от схемы клонирования смыслового и антисмыслового фрагментов с последовательностью CP-белка.

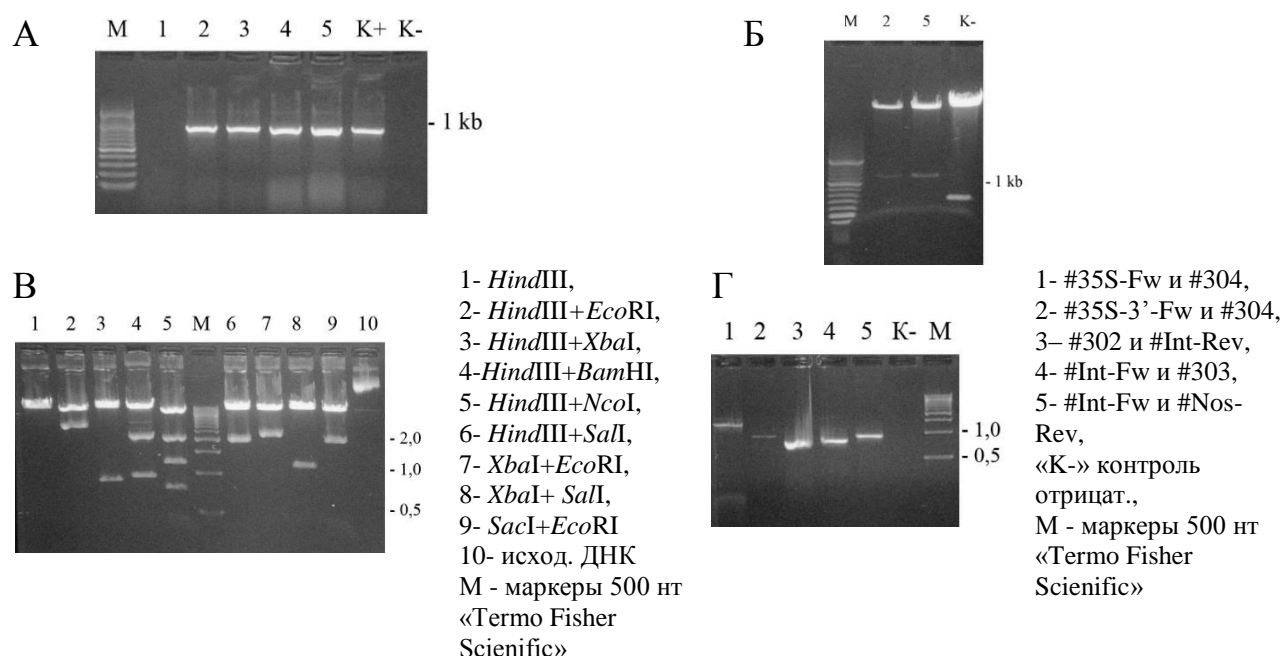
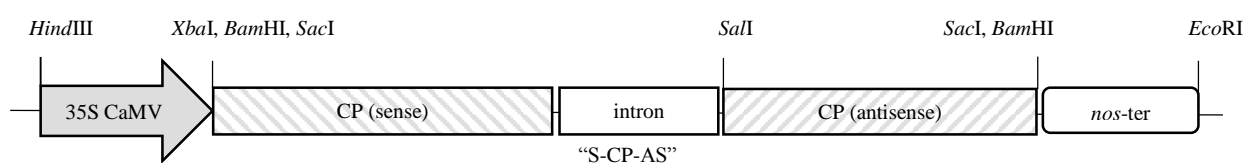


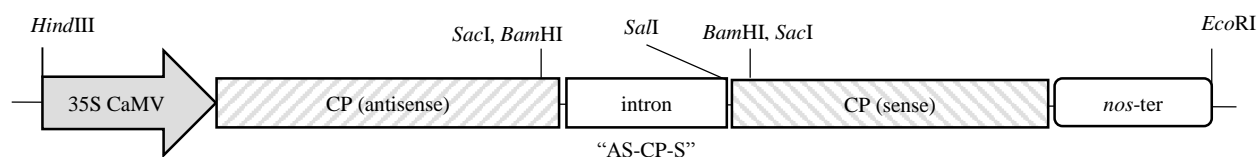
Рисунок 3.16, лист 1 – Результаты клонирования смыслового и антисмыслового фрагментов CP-белка PVS в состав бинарного агробактериального вектора pCAMBIA2300. А – Результаты электрофореза в агарозном геле продуктов ПЦР с участием праймеров #303 и #305, Б – результаты электрофореза продуктов рестрикционного анализа с участием

рестриктаз *Bam*HI и *Eco*RI. 1-5 – варианты анализируемых ДНК, М – маркеры (100 нт от «Fermentas»), «К+» - положительный контроль, «К-» – отрицательный контроль. В - электрофореграмма продуктов гидролиза ДНК-кассеты (справа от снимка указаны рестриктазы, использованные для анализа), Г – электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа ДНК-кассеты с участием пар праймеров (указаны справа от снимка). Электрофорез в обоих случаях проводили в 1,2 %-ном агарозном геле. Д – схема рекомбинантных ДНК-конструкций «S-CP-AS» и «AS-CP-S» (Е), Ж- схема рекомбинантных ДНК-конструкций «S-25K-AS» и «AS-25K-S» (З), полученных в результате клонирования фрагментов гРНК PVS.

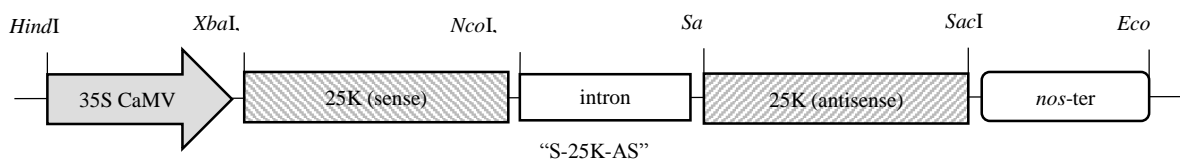
Д



Е



Ж



З

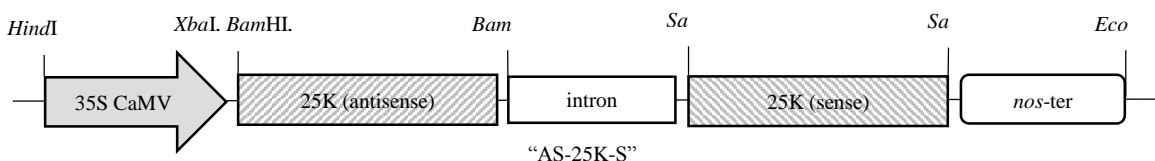


Рисунок 3.16, лист 2.

Праймеры #306 и #308, использованные для амплификации 25К-ДНК-фрагмента со смысловой ориентацией, содержали сайты рестрикции *Nco*I и *Bam*HI соответственно. Этот фрагмент был клонирован в вспомогательную ДНК-конструкцию «AtDR2A», изображенную на Рисунке 3.14, В, по указанным сайтам рестрикции. Затем из полученного варианта ДНК №6 был вырезан легкий фрагмент [*Hind*III – 35S CaMV – *Xba*I, *Bam*HI – 25K Sense – *Nco*I] и лигирован с тяжелым фрагментом, полученным в результате реакции рестрикции вспомогательной плазмидной ДНК «НУРО-GUS» (Рисунок 3.14, Б) с участием гидролаз *Hind*III и *Nco*I. Из созданной таким образом ДНК №7 в результате рестрикции был вырезан легкий фрагмент [*Hind*III – 35S CaMV – *Xba*I, *Bam*HI – 25K Sense – *Nco*I, *Bam*HI – intron – *Sal*I] и клонирован в исходную ДНК (Рисунок

3.14, В) по сайтам *Hind*III и *Sal*I. В итоге кодирующая последовательность 25К белка была клонирована под контроль промотора 35S CaMV в состав плазмиды pCAMBIA2300 (ДНК №8). Далее ДНК-фрагмент, синтезированный с помощью ПЦР с участием праймеров #307 и #308, был клонирован в состав плазмидной ДНК №8 по сайтам рестрикции *Sal*I и *Sac*I. В итоге была получена рекомбинантная ДНК «S-25K-AS», содержащая смысловую и антисмысловую ориентации кодирующей области 25К белка и схематично изображенная на Рисунке 3.16, Ж.

Для создания рекомбинантной ДНК «AS-25K-S», изображенной на Рисунке 3.16, З, была использована следующая схема клонирования. ДНК-продукт, несущий кодирующую последовательность 25К белка и полученный в результате ПЦР с участием праймеров #306 и #308, был клонирован в состав вспомогательной ДНК «HYPO-GUS» (Рисунок 3.14, Б) по сайтам рестрикции *Nco*I и *Bam*HI (ДНК №9). Далее с помощью ПЦР с участием праймеров #717 и #719 был синтезирован ДНК-фрагмент, содержащий кодирующую последовательность 25К белка в смысловой ориентации, который был клонирован в состав ДНК №9 по сайтам рестрикции *Sal*I и *Sac*I. В результате была получена ДНК №10. Далее из полученной ДНК №10 была вырезана кассета [*Nco*I – 25K-Asense - *Bam*HI – intron – *Sal*I - 25K-Sense – *Sac*I – *nos* – *Eco*RI], клонированная во вспомогательную ДНК «AtDR2A» (Рисунок 14, В) по сайтам рестрикции *Nco*I и *Eco*RI (ДНК №11). Затем из ДНК №11, обработанной рестриктазами *Hind*III и *Eco*RI, был получен легкий фрагмент, содержащий кассету [*Hind*III – 35S CaMV – *Xba*I, *Bam*HI - 5'-PVY - *Nco*I – 25K-Asense - *Bam*HI – intron – *Sal*I - 25K-Sense – *Sac*I – *nos* – *Eco*RI], затем клонированный в состав агробактериального вектора pCAMBIA2300 по сайтам рестрикции *Hind*III и *Eco*RI. Таким образом, была получена рекомбинантная ДНК «AS-25K-S», которая содержала кодирующую последовательность 25К белка в антисмысловой и смысловой ориентации от 5'- и 3'-конца интрона под контролем промотора 35S CaMV и *nos*-терминатора.

3.3.3 Получение штаммов агробактерий, несущих последовательности гРНК PVS

Рекомбинантные ДНК, несущие смысловые и антисмысловые фрагменты генов CP и 25К белка PVS, были использованы для проведения трансформации клеток *Agrobacterium tumefaciens* штамма pGV2260S методом электропорации.

В результате были получены варианты агробактерий, содержащие по одной из созданных ДНК-кассет, изображенных на рисунке 3.16, Д-З:

- [35S промотор CaMV – CP-Sense – intron – CP-Asense – *nos*] («S-CP-AS»),
- [35S промотор CaMV – CP-Asense – intron – CP-Sense – *nos*] («AS-CP-S»),
- [35S промотор CaMV – 25K-Sense – intron – 25K-ASense – *nos*] («S-25K-AS»),
- [35S промотор CaMV – 25K-Asense – intron – 25K-Sense – *nos*] («AS-25K-S»).

Полученные штаммы агробактерий, несущие шпилечные кассеты с последовательностями гРНК PVS, способные индуцировать РНКи против этого вируса, были использованы для проведения трансформации пробирочных растений картофеля.

3.3.4 Результаты трансформации растений картофеля

Трансформация картофеля была проведена методом ко-культивации коротких междоузлий побегов с одним из четырех вышеуказанных вариантов агробактерий. Для трансформации были использованы растения двух типов:

- семенной картофель 4-х российских сортов («Триумф», «Императрица», «Илона» и «Милена»), свободные от вирусной инфекции,
- пробирочные растения 12-ти сортов («Орбита», «Тохтар», «Альбинка», «Дуняша», «Зерен», «Санта», «Пикассо», «Кормилица», «Фортуна», «Тянь-Шаньский» и «Ушконоыр»), изначально инфицированных вирусами PVM, PVS и PVY одиночно или комплексно (Таблица 3.3).

Таблица 3.3 – Эффективность трансформации различных сортов картофеля

Название сорта (вариант вируса)	Вид ДНК-конструкции	Кол-во регенерантов (ед.)	Кол-во трансгенных побегов (ед.)	Эффективность трансформации сорта (%)
1	2	3	4	5
Семенной картофель				
Милена	«S-25K-AS»	32	17	44,6
	«S-25K-S»	20	5	
	«S-CP-AS»	6	3	
	«AS-CP-S»	20	5	
Илона	«S-25K-AS»	0	0	33,3
	«S-25K-S»	0	0	
	«S-CP-AS»	1	0	
	«AS-CP-S»	11	4	
Триумф	«S-25K-AS»	1	1	28,6
	«S-25K-S»	9	4	
	«S-CP-AS»	0	0	
	«AS-CP-S»	11	1	
Зараженный вирусами картофель				
Альбинка (PVM, PVY)	«S-25K-AS»	18	8	44,4
	«S-25K-S»	0	0	
	«S-CP-AS»	0	0	
	«AS-CP-S»	0	0	
Дуняша (PVM)	«S-25K-AS»	13	5	50,0
	«S-25K-S»	4	2	
	«S-CP-AS»	0	0	
	«AS-CP-S»	5	4	
Зерен (PVM, PVS, PVY)	«S-25K-AS»	15	4	28,6
	«S-25K-S»	6	2	
	«S-CP-AS»	0	0	
	«AS-CP-S»	0	0	
Кормилица (PVM)	«S-25K-S»	5	1	16,7
	«S-25K-S»	1	0	
	«S-CP-AS»	0	0	
	«AS-CP-S»	0	0	
Пикассо (PVM, PVY)	«S-25K-AS»	0	0	26,9
	«S-25K-S»	12	3	

	«S-CP-AS»	1	0	
	«AS-CP-S»	13	4	
Санта (PVM, PVY)	«S-25K-AS»	0	0	17,1
	«S-25K-S»	12	0	
	«S-CP-AS»	0	0	
	«AS-CP-S»	23	6	
Тохтар (PVM)	«S-25K-AS»	0	0	12,5
	«S-25K-S»	5	0	
	«S-CP-AS»	22	2	
	«AS-CP-S»	37	6	
Тянь- Шаньский (PVM)	«S-25K-AS»	1	0	0
	«S-25K-S»	17	0	
	«S-CP-AS»	5	0	
	«AS-CP-S»	0	0	
Фортуна (PVM, PVS)	«S-25K-AS»	0	0	30,0
	«S-25K-S»	1	0	
	«S-CP-AS»	0	0	
	«AS-CP-S»	9	3	

Трансформация семенного материала была проведена с целью создания трансгенных растений с генетически закрепленной устойчивостью к PVS, а трансформация растений, пораженных вирусами – с целью оздоровления растительного материала.

После проведения трансформации и инкубации эксплантов на питательных средах в течение 6-8 недель для большинства сортов были получены растения-регенеранты (Рисунок 3.17). Процессы регенерации и трансформации различных сортов проходили с разной эффективностью (Таблица 3.3). Среди семенного картофеля высокая эффективность регенерации наблюдалась у сорта «Милена» (было получено 77 побегов). Для сортов «Триумф» и «Илона» было получено соответственно 21 и 12 растений-регенерантов. Сорт «Императрица» плохо регенерировал: было получено только 2 растения. Среди зараженного вирусами картофеля очень плохо отзывались на регенерацию три сорта: «Ушконыр» (не было получено ни одного побега) и «Орбита» (получено 3-и растения-регенеранта). В отличие от них сорта «Пикассо», «Санта» и «Тохтар» в результате регенерации давали многочисленные побеги. Наилучшие результаты по трансформации получены у сортов «Альбинка», «Дуняша», «Зерен» и «Пикассо» (Таблица 3.3). Побегов, полученных в процессе регенерации, было не так много, однако количество трансгенных растений этих сортов превысило 25 %.

Далее все укоренившиеся побеги были проверены на присутствие рекомбинантных ДНК-последовательностей, способных индуцировать в клетках растений РНКи против гРНК PVS. Для этого из листьев полученных растений-регенерантов были выделены препараты тотальных ДНК. С участием выделенных препаратов тотальных ДНК был проведен мПЦР-анализ. Реакции были проведены с участием 0,5 мкг тотальных ДНК и двух пар праймеров. В качестве первой пары использовалась #306 и #308 (в случае белка 25К) или #713

и #714 (в случае CP-белка), в качестве второй пары – #*virD*-Fw и #*virD*-Rev (Таблица 2.3).

Таким образом, образцы ДНК были проанализированы на присутствие трансгенных ДНК-фрагментов PVS размером около 900 нт для CP-белка и 750 нт для 25К белка, соответствующих рекомбинантным ДНК, а также на наличие фрагмента размером около 500 нт, который указывает на присутствие агробактериальной инфекции. Результаты анализа представлены на Рисунке 3.18. Образцы №82, 172 и 179 на Рисунке 3.18, А показали положительный ответ как на присутствие трангена, так и на присутствие агробактерий. Все остальные образцы оказались чистыми от агробактерий.

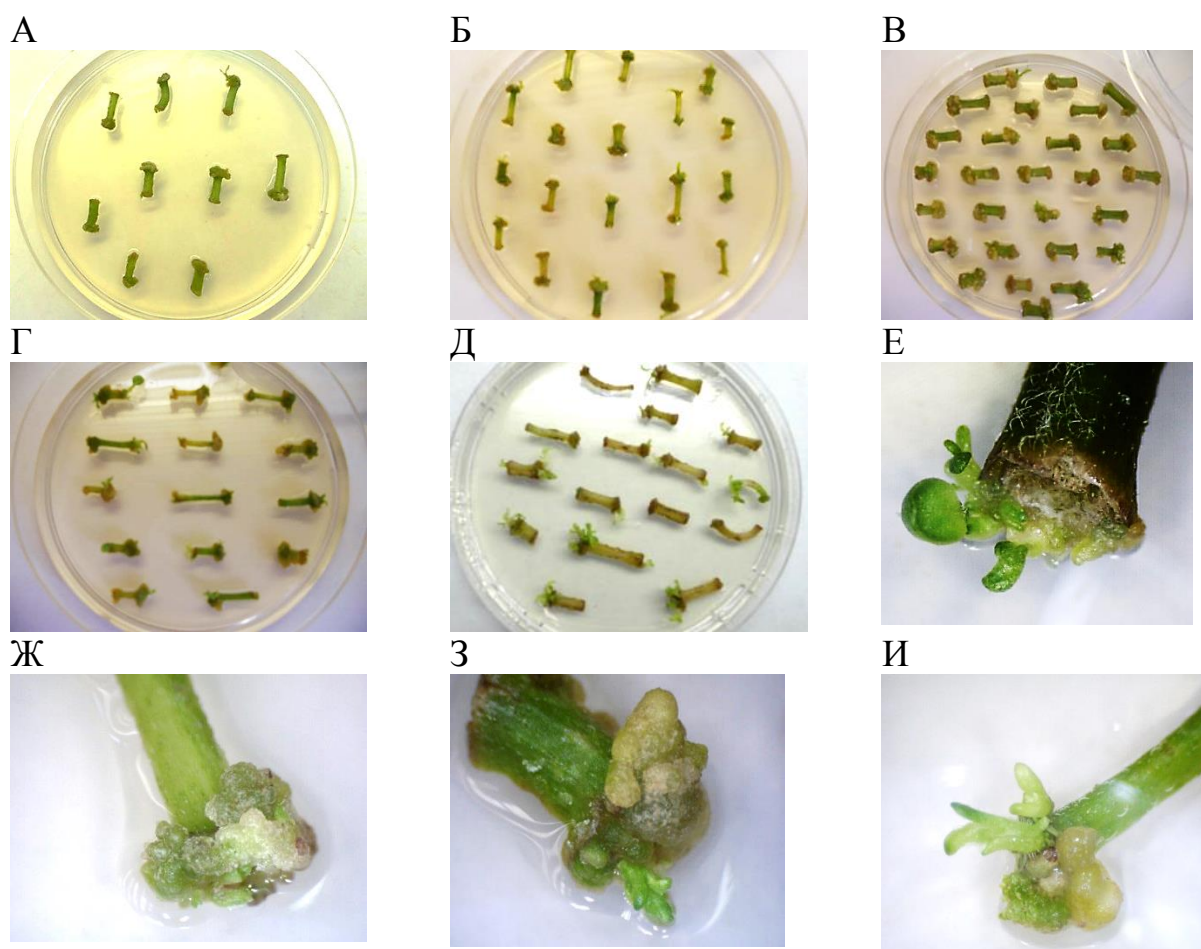


Рисунок 3.17 – Побегообразование в ходе трансформации различных сортов картофеля после 5-6 недель инкубации на питательных средах А – сорт «Кормилица», Б – сорт Тянь-Шаньский, В и И – сорт «Зерен», Г – сорт «Тохтар», Д – сорт «Милена», Е – сорт «Илона», Ж – сорт «Фортуна». Е-И - 200х увеличение.

В результате, положительный ответ на присутствие рекомбинантных ДНК был получен у сорта «Милена» в 32 образцах, у сортов «Триумф» и «Илона» в 6 и 4 образцах соответственно. Таким образом, эффективность трансформации

составила для сорта «Милена» - 44,6%, для сорта «Илона» - 33,3%, для сорта «Триумф» - 28,6% (Таблица 3.3). У сорта «Императрица» обнаружено только одно растение с ДНК-вставкой из двух полученных регенерантов. После проведения анализа далее работа велась с растениями, показавшими отсутствие агроинфекции.

Среди зараженных вирусами сортов картофеля, наибольшей эффективностью трансформации обладали «Дуняша» (50,0%), «Альбинка» (44,4%) и «Фортуна» (30%); средней – «Зерен» и «Пикассо» (28,6% и 26,9%, соответственно). Наименьшую эффективность трансформации продемонстрировали сорта «Санта», «Кормилица» и «Тохтар» (17,1%, 16,7% и 12,5%, соответственно). Хотя сорт казахстанской селекции «Тянь-Шаньский» и проявлял высокую регенерационную активность (получено 23 растения-регенеранта), однако не удалось получить ни одного растения, давшего положительный ответ на присутствие вставки рекомбинантной ДНК при ПЦР-анализе. Таким образом, эффективность трансформации сорта «Тянь-Шаньский» составила 0%.

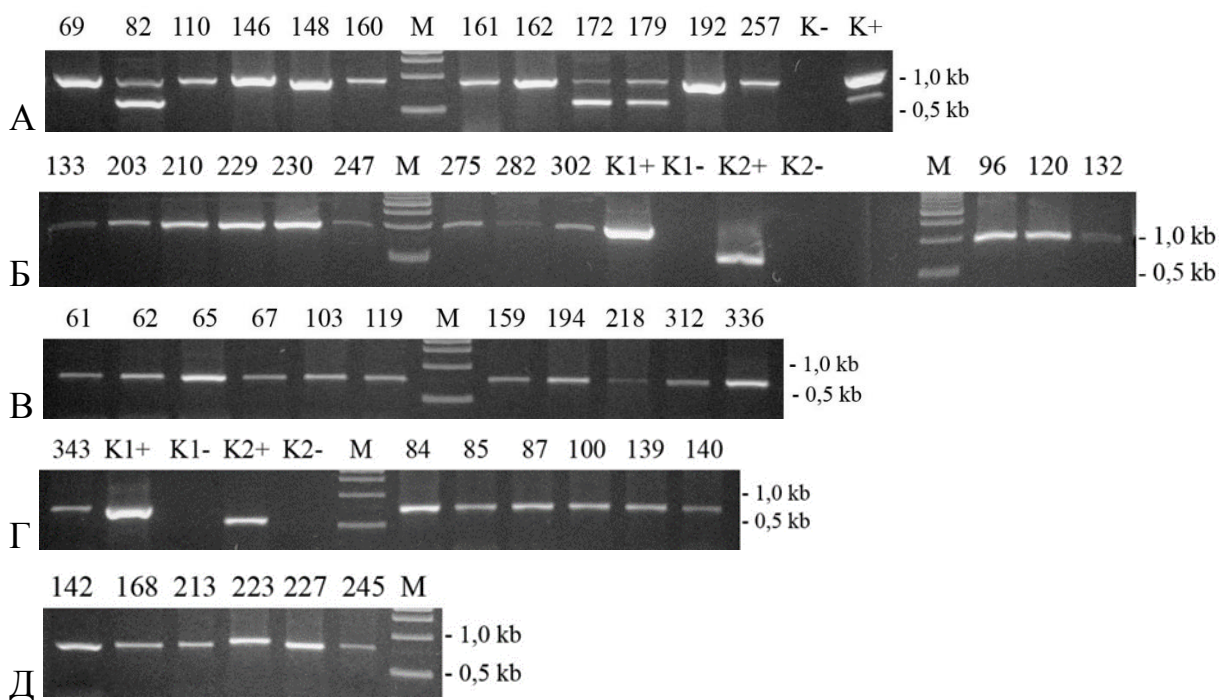


Рисунок 3.18 – Результаты электрофореза в 1,2%-ном агарозном геле продуктов мультиплексного ПЦР-анализа с участием препаратов тотальных ДНК картофеля и пар праймеров #713 и #714 (А и Б) или #306 и #308 (В, Г и Д), а также #*virD*-Fw #*virD*-Rev. Сверху фотографий указаны номера трансгенных линий картофеля, несущих кодирующие последовательности СР-белка (А и Б) или 25К-белка (В, Г и Д), справа – размеры ДНК-фрагментов маркера 500 нт от «Thermo Fisher Scientific». «К-», «К1-» и «К2-» - отрицательный контроль, «К+», «К1+» и «К2+» - положительный контроль.

При проведении ПЦР-анализа регенерантов, было отмечено, что трансгенных растений со вставкой, кодирующей CP-белок было намного меньше, чем со вставкой, кодирующей 25K белок (Рисунок 3.19). Растений-регенерантов для обеих кодирующих последовательностей было получено приблизительно равное количество (192 и 198 растений, соответственно). При этом, растений-регенерантов после трансформации прямыми ДНК-шпильками было получено 43 линии для S-CP-AS и 87 линий для S-25K-AS, а количество растений-регенерантов для обратных шпилек составляло 149 и 111 для AS-CP-S и AS-25K-S, соответственно. Среди полученных растений, большее число линий были трансгенны по 25K белку PVS – 60 вариантов против 36 для CP PVS. Число трансформантов, несущих в своем геноме рекомбинантную ДНК-шпильку, кодирующую CP-белок было следующее: 6 линий растений для прямой шпильки S-CP-AS и 30 вариантов линий для обратной AS-CP-S. Количество трансгенных линий, полученных после трансформации S-25K-AS составляло 38 растений, а для обратной шпильки AS-25K-S – 22 варианта.

Таким образом, наибольшее количество трансгенных растений было получено при использовании для трансформации прямой шпильки S-25K-AS (Рисунок 3.19), эффективность трансформации в этом случае составляла 43,68%. Использование кодирующей последовательности белка оболочки вируса PVS менее эффективно по сравнению с 25K белком, по всей вероятности, из-за особенностей нуклеотидного состава кодирующей последовательности этого белка.

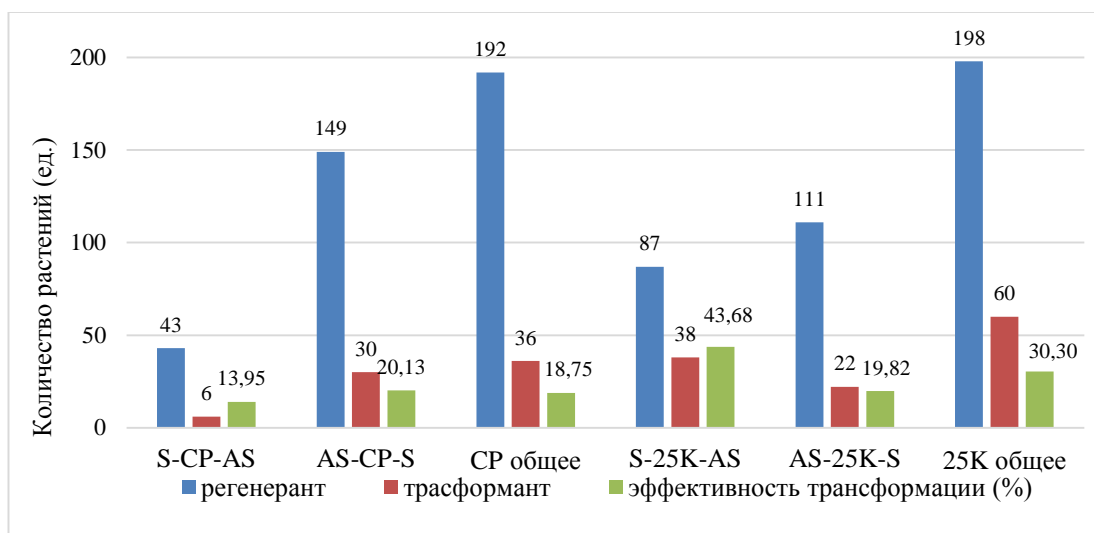


Рисунок 3.19 – Сравнение эффективности трансформации картофеля четырьмя вариантами ДНК-конструкций.

Из листьев растений, которые показали положительный ответ на присутствие рекомбинантных ДНК-последовательностей, выделяли РНК по стандартной методике с использованием тризола. С помощью реакции обратной транскрипции и сопряженной ПЦР проводили анализ на наличие РНК-

транскриптов, соответствующих нуклеотидным последовательностям гРНК PVS. Реакцию проводили с участием выделенных препаратов РНК (для каждого образца по 5 мкг) и одной из пар праймеров #713 и #714 для анализа на СР; #711 и #712 для вариантов с 25К белком. В результате было показано, что в клетках большинства растений присутствуют РНК-транскрипты, способные индуцировать в клетках растений РНКи против гРНК PVS (Рисунок 3.20).

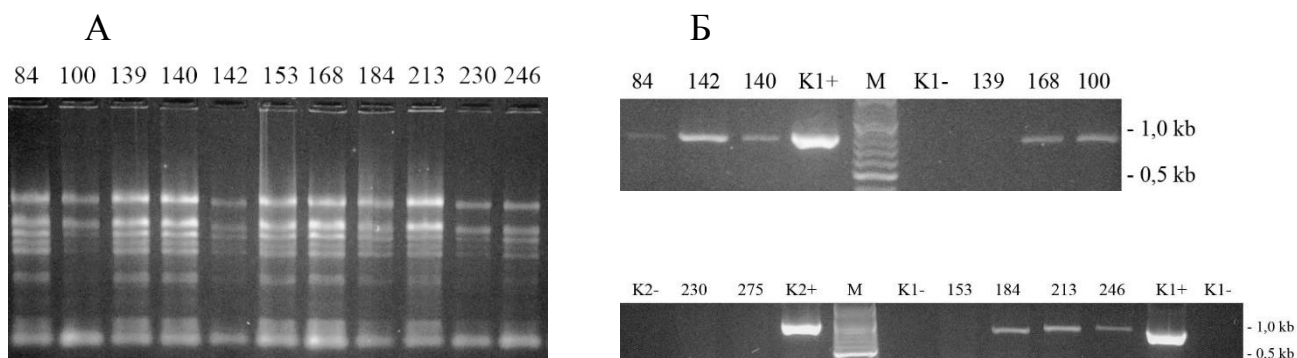


Рисунок 3.20 – Результаты электрофореза в 1,2%-ном агарозном геле препаратов тотальных РНК, выделенных из листьев трансгенных растений картофеля (А), и продуктов реакции обратной транскрипции и сопряженной ПЦР (Б). Для проведения РОТ-ПЦР были использованы праймеры #713 и #Int-Rv (Б, верхний ряд), #307 и #Int-Rv (Б, нижний ряд). Сверху приведены номера линий, справа – размеры ДНК-фрагментов маркера 500 нт от «Thermo Fisher Scientific». «K1-» и «K2-» - отрицательный контроль, «K1+» и «K2+» - положительный контроль.

Далее трансгенные растения были размножены черенкованием в достаточном количестве, высажены в почву для получения микроклубней и/или использованы для проведения тестов на устойчивость к заражению вирусом PVS.

3.3.5 Тестирование трансгенного картофеля на устойчивость к PVS в лабораторных условиях

Через 2-3 недели роста в условиях теплицы трансгенные растения, полученные из семенного картофеля сортов «Триумф», «Императрица», «Илона» и «Милена», были заражены вирусом PVS. Для инокуляции был использован вирусный гомогенат из листьев растения сорта «Ушконыр», зараженного PVS по показаниям ИФА и выращенного из клубней в течение 2-х месяцев в условиях теплицы. Образцы для ИФА снимали с зараженных растений с интервалом 2 недели в течение трех месяцев после инокуляции PVS. Результаты ИФА после заражения вирусом представлены в Таблице 3.4.

Прежде всего, эффективность заражения была испытана на контрольных вариантах растений каждого сорта. Через 1 месяц после инокуляции вирусным гомогенатом из 6 растений сорта «Триумф» заразились 3 варианта, у сорта

«Милена» 7 из 17 растений, «Илона» 2 из 4-х, и 4-е из 8-ми растений сорта «Императрица» были поражены вирусом PVS. Результаты ИФА растений после 2-х месяцев постинокуляции вирусной суспензией продемонстрировали, что заражение может проявляться на более поздних сроках. Так, контрольное растение №1 сорта «Триумф» оказалось пораженным PVS после 2-х и 3-х месяцев после заражения.

Таблица 3.4 – Результаты тестирования трансгенных растений семенного картофеля на устойчивость к PVS

Сорт и/или линия (вариант трансгена)	Номер повторности	Присутствие РНК-транскриптов	Показания ИФА					
			до заражения	через 2 недели после заражения	через 4 недели после заражения	через 6 недель после заражения	через 8 недель после заражения	через 12 недель после заражения
Триумф (контроль)	1	-	-	-	-	-	+	+
	2	-	-	*	+	*	*	*
	3	-	-	*	+	*	*	*
	4	-	-	*	+	*	*	*
	5	-	-	*	-	*	*	*
	6	-	-	-	+	-	*	*
Триумф 246 (S-25K-AS)	1	+	-	*	*	*	*	*
	2	+	-	*	-	*	*	*
	3	+	-	*	-	*	*	*
	4	+	-	*	-	*	*	*
	5	+	-	*	-	*	-	*
	6	+	-	*	-	*	-	*
	7	+	-	*	-	*	-	*
	8	+	-	*	-	*	-	*
Триумф 269 (AS-25K-S)	1	-	-	*	-	*	-	*
	2	-	-	*	-	*	-	*
	3	-	-	*	-	*	-	*
	4	-	-	*	+	*	*	*
	5	-	-	*	-	*	*	*
Императрица (контроль)	1	-	-	*	-	*	*	*
	2	-	-	*	+	*	*	*
	3	-	-	*	+	*	*	*
	4	-	-	*	-	*	*	*
	5	-	-	*	+	*	*	*
	6	-	-	*	+	*	*	*
	7	-	-	-	-	*	*	*
	8	-	-	-	-	*	*	*
Императрица 120 (S-CP-AS)	1	+	-	-	-	*	*	*
	2	+	-	+	-	*	*	*
	3	+	-	*	-	*	*	*
	4	+	-	*	-	*	*	*
Милена (контроль)	1	-	-	-	-	*	-	*
	2	-	-	-	-	*	-	*
	3	-	-	-	-	*	-	*
	4	-	-	-	+	*	+	*
	5	-	-	-	+	*	+	*

	6	-	-	-	-	*	+	*
	7	-	-	-	+	*	-	*
	8	-	-	-	+	*	-	*
	9	-	-	-	-	*	*	*
	10	-	-	*	-	*	*	*
	11	-	-	*	-	*	*	*
	12	-	-	*	+	*	-	*
	13	-	-	*	+	*	+	*
	14	-	-	*	-	*	-	*
	15	-	-	*	+	*	+	*
	16	-	-	*	-	*	-	*
	17	-	-	*	-	*	-	*
Милена 84 (S-25K-AS)	1	+	-	-	-	*	-	*
	2	+	-	-	-	*	*	*
Милена 85 (S-25K-AS)	1	+	-	-	-	*	-	*
	2	+	-	-	-	-	-	*
Милена 87 (S-25K-AS)	1	+	-	-	-	*	*	*
	2	+	-	-	-	*	*	*
	3	+	-	-	-	*	*	*
	4	+	-	-	-	*	*	*
	5	+	-	-	-	*	*	*
	6	+	-	*	-	*	-	*
	7	+	-	*	-	*	-	*
	8	+	-	*	-	*	-	*
Милена 100 (S-25K-AS)	1	+	-	-	-	-	-	*
	2	+	-	-	-	-	-	*
	3	+	-	*	-	*	-	*
	4	+	-	*	-	*	-	*
	5	+	-	*	-	*	-	*
	6	+	-	*	-	*	-	*
Милена 139 (S-25K-AS)	1	-	-	-	-	*	*	*
	2	-	-	-	-	-	*	*
Милена 140 (S-25K-AS)	1	+	-	-	-	*	-	*
	2	+	-	-	-	-	-	*
	3	+	-	-	-	-	-	*
Милена 142 (S-25K-AS)	1	+	-	-	-	-	-	*
	2	+	-	-	-	*	-	*
Милена 168 (S-25K-AS)	1	+	-	-	-	-	*	*
	2	+	-	-	-	-	-	*
Милена 184 (S-25K-AS)	1	+	-	*	-	*	*	*
	2	+	-	*	-	*	*	*
Милена 210 (AS-CP-S)	1	+	-	*	-	*	*	*
Милена 213 (S-25K-AS)	1	+	-	*	-	*	*	*
	2	+	-	*	-	*	*	*
Милена 227 (S-25K-AS)	1	+	-	*	-	*	*	*
	2	+	-	*	-	*	*	*
	3	+	-	*	-	*	*	*

Милена 229 (AS-CP-S)	1	+	-	*	-	*	*	*
Милена 272 (AS-25K-S)	1	+	-	*	-	*	-	-
	2	+	-	*	-	*	-	*
	3	+	-	*	-	*	-	-
	4	+	-	*	-	*	-	*
Милена 276 (S-25K-AS)	1	+	-	*	-	*	*	*
	2	+	-	*	-	*	*	*
	3	+	-	*	-	*	*	*
	4	+	-	*	-	*	-	-
	5	+	-	*	-	*	*	*
	6	+	-	*	-	-	-	-
Милена 278 (S-25K-AS)	1	+	-	*	-	-	*	*
	2	+	-	*	-	-	-	-
	3	+	-	*	-	-	-	-
	4	+	-	*	-	-	*	*
	5	+	-	*	-	-	-	-
Милена 279 (S-25K-AS)	1	+	-	*	-	-	-	*
	2	+	-	*	-	*	*	*
	3	+	-	*	-	*	*	*
	4	+	-	*	-	-	-	-
	5	+	-	*	-	-	-	-
	6	+	-	*	-	-	-	-
	7	+	-	*	-	-	-	-
Милена 282 (S-CP-AS)	1	-	-	*	+	+	+	
	2	-	-	*	-	-	*	*
Милена 327 (S-CP-AS)	1	+	-	*	-	-	-	-
	2	+	-	*	-	*	*	*
	3	+	-	*	-	-	-	-
	4	+	-	*	-	*	*	*
Милена 328 (S-CP-AS)	1	+	-	*	+	*	*	*
	2	+	-	*	-	-	-	-
	3	+	-	*	-	-	-	-
Милена 330 (AS-CP-S)	1	+	-	*	-	*	*	*
	2	+	-	*	-	*	*	*
	3	+	-	*	-	*	*	*
	4	+	-	*	-	*	*	*
	5	+	-	*	-	*	*	*
	6	+	-	*	-	-	-	-
	7	+	-	*	-	-	-	-
	8	+	-	*	-	*	-	-
	9	+	-	*	-	-	-	-
Илона (контроль)	1	-	-	-	+	*	+	*
	2	-	-	*	+	*	+	*
	3	-	-	*	-	*	*	*
	4	-	-	*	-	*	*	*
Илона 96 (AS-CP-S)	1	+	-	-	-	*	*	*
	2	+	-	-	-	-	-	*

- отрицательный результат
+ положительный результат
* не детектировалось из-за гибели растения или недостаточного количества ткани для анализа

Среди контрольных растений сорта «Милена» после 2-х месяцев культивирования постинокуляции вирусом 5 растений оказались зараженными: №4, 5, 6, 13 и 15, хотя ранее (1 месяц после инокуляции) присутствие вирусной инфекции обнаруживалось в 7 растениях – №4, 5, 7, 8, 12, 13 и 15. Результаты ИФА контрольных растений сорта «Илона» соответствовали таковым после 1 месяца культивирования постинокуляции вирусом.

Таким образом, эффективность заражения составляла 50% и менее, большинство растений, использованных для заражения погибли после 1 месяца после инокуляции вследствие повреждения листовых пластинок в месте заражения. Хотя, использование пробирочных растений для испытаний на заражение вирусным гомогенатом было признано малоэффективным методом изучения устойчивости к поражению вирусной инфекцией, было решено провести испытания трансгенных линий растений на устойчивость к заражению в лабораторных условиях. Низкая эффективность заражения контрольных растений могла быть связана с подготовкой вируса к инфицированию растений на молекулярном уровне в ротовом аппарате тли – основного переносчика вирусных заболеваний картофеля.

В испытаниях на устойчивость к заражению были использованы 2 типа трансгенных линии картофеля – как транскрибирующие вставку (РНК+), так не имеющие транскриптов с рекомбинантной ДНК. Так, линия №246 (вариант трансгенной конструкции S-25K-AS, РНК+) и №269 (AS-25K-S, РНК-) сорта «Триумф» показали, что ни одно растение из 8 варианта №246 не заразилось вирусом PVS, в то время, как одно растение из 5 не транскрибирующей линии №269 оказалось инфицированным. На основе сорта «Императрица» была получена одна транскрибирующая трансгенная линия №120 (S-CP-AS), из 4-х опытных растений которой вирусом после 2 недель постинокуляции заразилось только одно растение, однако оно было свободно от вируса PVS после 1 месяца выращивания.

Больше всего трансгенных линий картофеля было получено на основе сорта «Милена», однако только по одному растению линий №282 (S-CP-AS, РНК-) и №328 (S-CP-AS, РНК+) из 2-х и 3-х, соответственно, оказались инфицированными в результате инокуляции вирусным гомогенатом. Исследованная линия №96 (AS-CP-S), на основе сорта «Илона», имела транскрипты РНК и оказалась свободной от вирусного заражения через 2 месяца постинокуляции.

Таким образом, в итоге трансформации растений картофеля были созданы линии, которые показали задержку заражения вирусом PVS по сравнению с контрольными вариантами.

3.3.6 Оздоровление зараженного вирусами картофеля с помощью трансформации

На основе зараженных вирусами сортов картофеля казахстанской («Альбинка» (PVM и PVY), «Дуняша» (PVM), «Зерен» (PVM, PVS и PVY), «Кормилица» (PVM), «Орбита» (PVM), «Тохтар» (PVM) и «Фортуна» (PVM и PVS)) и зарубежной селекции («Санта» (PVM и PVY) и «Пикассо» (PVM и PVY))

было получено 50 линий трансгенных растений. Для изучения влияния трансгена на процесс оздоровления трансформанты и их родительские растения были высажены в почву в условия теплицы. Образцы с этих растений были тестированы ИФА дважды через 2 и 4 месяца с целью наблюдения за изменениями вирусного заражения в течение полугода после проведения трансформации (Таблица 3.5).

Таблица 3.5 – Результаты лабораторных испытаний трансгенных линий, полученных на основе зараженных сортов картофеля. Красным цветом отмечены перспективные линии трансгенных растений, освободившиеся от карлавирусной инфекции [251].

Сорт (вирусная инфекция до трансформации)	Линия №	Вариант трансгена	Результаты ИФА на присутствие вирусной инфекции								
			До высадки в почву			Через 2 месяца после высадки в почву			Через 4 месяца после высадки в почву		
			PVS	PVM	PVY	PVS	PVM	PVY	PVS	PVM	PVY
Альбинка (PVM + PVY)	Род.	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+
	39	S-25K-AS	-	+	+	-	-	+	-	-	+
	43	S-25K-AS	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	46	S-25K-AS	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	47	S-25K-AS	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	48	S-25K-AS	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	74	S-25K-AS	-	+	+	-	-	+	-	-	+
	159	S-25K-AS	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	218	S-25K-AS	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Дуняша (PVM)	Род.	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	44	S-25K-AS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	61	S-25K-AS	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	62	S-25K-AS	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	65	S-25K-AS	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	67	S-25K-AS	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	146	AS-CP-S	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	162	AS-CP-S	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	293	AS-CP-S	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	294	AS-CP-S	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	312	AS-25K-S	-	+	-	-	+	-	-	+	-
374	AS-25K-S	-	+	-	-	+	-	-	+	-	
Фортуна (PVS + PVM)	Род.	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	309	AS-CP-S	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	360	AS-CP-S	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	361	AS-CP-S	+	+	-	+	+	-	+	+	-
Кормилица (PVS)	Род.	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	103	S-25K-AS	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Орбита (PVM)	Род.	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	148	AS-CP-S	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Пикассо (PVM + PVY)	Род.	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+
	161	AS-CP-S	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	172	AS-CP-S	-	-	+	-	-	+	-	+	+
	192	AS-CP-S	-	-	+	-	+	+	-	-	+
	194	AS-25K-S	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	257	AS-CP-S	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	351	AS-25K-S	-	+	+	-	+	+	-	+	+
	352	AS-25K-S	-	-	+	-	+	+	-	+	+
381	AS-25K-S	-	+	+	-	+	+	-	+	+	

	383	AS-25K-S	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Санта (PVM + PVY)	Род.	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	291	AS-CP-S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	295	AS-CP-S	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	339	AS-CP-S	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Тохтар (PVM)	Род.	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	69	S-CP-AS	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	82	S-CP-AS	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	110	AS-CP-S	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	160	AS-CP-S	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	179	AS-CP-S	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	314	AS-CP-S	-	+	-	-	+	-	*	*	*
	315	AS-CP-S	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	316	AS-CP-S	-	+	-	-	+	-	*	*	*
	398	AS-CP-S	-	+	-	-	+	-	*	*	*
Зерен (PVS + PVM + PVY)	Род.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	38	S-25K-AS	+	+	+	+	-	-	+	-	-
	59	S-25K-AS	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	119	S-25K-AS	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	344	AS-25K-S	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	336	AS-25K-S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- отрицательный результат + положительный результат * не детектировалось из-за гибели растения или недостаточного количества ткани для анализа											

В период выращивания трансформантов в условиях теплицы три сорта картофеля, исходно зараженные вирусом PVS продемонстрировали освобождение от вирусной инфекции. Так, из трёх трансгенных линий сорта «Фортуна» от PVS освободилась одна линия (№360), 2 из 5 линии сорта «Зерен» (№119 и №336) и единственная линия, полученная на основе сорта «Кормилица» (№103). Все эти варианты линий были получены при использовании различных конструкций для трансформации. Линия №360 несла в составе генома рекомбинантную ДНК-конструкцию AS-CP-S, №103 и №119 были трансформированы прямой шпилькой S-25K-AS, а 336 – обратной шпилькой ДНК AS-25K-S.

Наблюдения показали, что некоторые варианты линий в результате трансформации освободились от родственного вируса PVM (относится к роду карлавирусов, как и PVS) и неродственного вируса (PVY). Так, свободными от вируса PVM оказались 7 из 8 трансгенных линий, полученных на основе сорта «Альбинка» (линии №39, 43, 46, 47, 48, 74 и 159), 4 из 11 растений «Дуняша» (линии №44, 61, 67 и 146), 3 из 9 линий на основе «Пикассо» (№192, 194 и 383), две линии из 5 на основе «Зерен» (№119 и 336) и по одной линии для сортов «Санта» (№291) и «Кормилица» (№103). От PVY в результате выращивания в теплице освободились трансформанты, полученные на основе двух сортов «Пикассо» (№161, 257 и 383) и «Зерен» (№38, 119, 336 и 344). Хотя элиминация карлавирусов обычно не зависела от присутствия какой-либо конкретной трансгенной конструкции, большее количество свободных от карлавирусов линий было получено с конструкциями 25K (n = 15), чем с конструкциями CP (n = 3) (Таблица 3.5).

Таким образом, в результате лабораторных испытаний, полностью от вирусных инфекций были освобождены 4 линии на основе сорта «Дуняша» (№44, 61, 67 и 146), по одной линии сортов «Кормилица» (№103), «Пикассо» (№383), «Санта» (№291) и две линии, полученные от сорта «Зерен» (№119 и №336) (Таблица 3.5). Микроклубни этих и других перспективных линий трансгенного картофеля (см. Таблицу 3.5), полученные в результате выращивания в теплице, были использованы для полевых испытаний растений на устойчивость к вирусному заражению.

3.3.7 Полевые испытания трансгенных растений на устойчивость к вирусам

Микроклубни ПЦР-положительных трансгенных линий, полученные для сортов «Альбинка» (n = 8), «Дуняша» (n = 11), «Фортуна» (n = 3), «Кормилица» (n = 1), «Пикассо» (n = 11), «Санта» (n = 3) и «Зерен» (n = 5), а также потомственные клубни соответствующих нетрансформированных родительских растений и три дополнительных сорта были отобраны для трехлетних полевых испытаний в 2017, 2018 и 2019 годах (Таблица 3.6). Каждая линия была проверена на присутствие вирусных инфекций с помощью ИФА трижды за сезон. По итогам первого сезона 17 из 42 линий оказались безвирусными, в том числе 7 линий сорта «Дуняша» (№44, 62, 67, 146, 162, 294 и 312), 3 линии «Пикассо» (№257, 382 и 384), по 2 линии сортов «Альбинка» (№43 и №46) и «Зерен» (№119 и №336) и по одной линии, полученные на основе сортов «Фортуна» (№360), «Санта» (№291) и «Кормилица» (№103). Семь из этих линий (№43, 44, 62, 67, 46, 103 и 119) были трансформированы конструкцией S-25K-AS, 4 линии (№312, 336, 382 и 384) конструкцией AS-25K-S, и 6 линий (№146, 162, 257, 291, 294, 360 и 384) несли в своем геноме трансген AS-CP-S. Другие 25 линий были заражены одиночной инфекцией PVY (n = 7), вирусов PVM (n = 9) и PVS (n = 2); также комплексной инфекцией вирусов PVM + PVY (n = 4) или PVS + PVY (n = 3) (Таблица 3.6). Не трансформированные сорта картофеля «Императрица» и «Милена» заразились вирусом PVM, а «Триумф» остался свободным от вирусной инфекции. Эти результаты говорят о том, что на опытном участке существовал высокий фон вирусного заражения.

Таблица 3.6 – Результаты трехлетних полевых испытаний трансгенного картофеля на устойчивость к вирусному заражению [251].

Сорт (вирусная инфекция до трансформации)	Линия №	Вариант трансгена	Результаты ИФА		
			2017 г.	2018 г.	2019 г.
Альбинка (PVM + PVY)	Род.	-	PVM	PVY	PVM PVY
	39	S-25K-AS	PVY	PVY	PVY
	43	S-25K-AS	-	*	*
	46	S-25K-AS	-	PVY	PVY
	47	S-25K-AS	PVY	*	*
	48	S-25K-AS	PVM PVY	PVY	PVY

	74	S-25K-AS	PVY	PVY	PVS PVM PVY
	159	S-25K-AS	PVY	PVY	*
	218	S-25K-AS	PVM PVY	*	*
Дуняша (PVM)	Род.	-	-	PVM	PVM PVY
	44	S-25K-AS	-	-	PVY
	61	S-25K-AS	PVM	-	-
	62	S-25K-AS	-	-	PVY
	65	S-25K-AS	PVM	-	PVY
	67	S-25K-AS	-	-	PVY
	146	AS-CP-S	-	-	-
	162	AS-CP-S	-	-	-
	293	AS-CP-S	PVM	-	PVS
	294	AS-CP-S	-	-	-
	312	AS-25K-S	-	-	PVM
	374	AS-25K-S	PVM	-	PVY
Фортуна (PVS + PVM)	Род.	-	*	PVS	PVS
	309	AS-CP-S	PVS	PVS	PVS
	360	AS-CP-S	-	-	-
	361	AS-CP-S	PVS PVY	PVS	-
Кормилица (PVS)	Род.	-	*	*	*
	103	S-25K-AS	-	-	-
Пикассо (PVM + PVY)	Род.	-	*	*	*
	192	AS-CP-S	PVY	PVY	PVY
	194	AS-25K-S	PVM	PVY	PVY
	257	AS-CP-S	-	-	PVY
	351	AS-25K-S	PVM PVY	PVY	PVY
	161	AS-CP-S	PVM	*	*
	172	AS-CP-S	PVY	*	*
	352	AS-25K-S	PVM PVY	*	*
	381	AS-25K-S	PVY	*	*
	382	AS-25K-S	-	*	*
	383	AS-25K-S	PVM	*	*
	384	AS-25K-S	-	*	*
	Санта (PVM + PVY)	Род.	-	PVM	PVM PVY
295		AS-CP-S	PVM	PVS PVY	PVY
291		AS-CP-S	-	*	*
339		AS-CP-S	PVM	*	*
Зерен (PVS + PVM + PVY)	Род.	-	*	*	PVS PVY
	38	S-25K-AS	PVS PVY	PVS PVY	PVS PVY
	59	S-25K-AS	PVS PVY	PVS PVY	PVS PVY
	119	S-25K-AS	-	PVY	PVY
	336	AS-25K-S	-	-	PVY
	344	AS-25K-S	PVS	PVS	PVS

				PVY	PVY
Триумф	Не трансформированный	-	-	PVM PVY	PVM PVY
Императрица	Не трансформированный	-	PVM	*	*
Милена	Не трансформированный	-	PVM	PVM PVY	PVM PVY
- отрицательный результат * не детектировалось из-за гибели растения или недостаточного количества ткани для анализа					

В 2018 г. клубни 30 трансгенных линий (в том числе 13 безвирусных линий) полученные в качестве урожая первого сезона были вновь высажены в поле (Таблица 3.6). К концу второго сезона результаты ИФА продемонстрировали отсутствие карлавирусной инфекции во всех 11 протестированных трансгенных линиях на основе «Дуняши» (№44, 61, 62, 65, 67, 146, 162, 293, 294, 312, 374), по одной из 3-х линий «Фортуны» (№360), 5-ти линий «Зерена» (№336), 5-ти линий сорта «Пикассо» (№257) и одна проверенная линия Кормилицы (№103). Все упомянутые сорта картофеля были инфицированы по крайней мере одним карлавирусом (совместно с PVY или без него) до трансформации (Таблица 3.5). Одиночная инфекция PVY выявлена у всех 5 протестированных линий на основе «Альбинки» и 3 из 4 линий «Пикассо» (обе исходно коинфицированы PVM и PVY), а также в одной из 5-ти линий сорта «Зерен» (изначально инфицированный PVS, PVM и PVY). С другой стороны, одиночная инфекция вируса PVS была найдена у 2 из 3 линий трансформантов на основе сорта «Фортуна» (изначально инфицированный PVS и PVM), в то время как двойные инфекции были обнаружены в одной тестируемой линии сорта «Санта» (изначально зараженный PVM и PVY) и 3-х из 5-ти линий сорта «Зерен» (Таблица 3.6). В этом сезоне тестировались только два контрольных сорта без трансформации поскольку растения сорта «Императрица» не дали урожая клубней по итогам первого сезона полевых испытаний. Оба сорта «Триумф» и «Милена» заразились комплексной инфекцией PVY + PVM.

В 2019 г. полевые испытания, проведенные на 29 трансгенных линиях второго сезона, показали, что большинство из них были свободны от PVS (n = 23) и PVM (n = 27), но инфицированы PVY (n = 19) (Таблица 3.6). В 4-х из 11-ти линий «Дуняши» (№61, 146, 162, 294), в 2-х из 3-х линий «Фортуны» (№360 и 361) и в одной линии «Кормилицы» (№103) вирус не был обнаружен. Одиночная инфекция PVY выявлена у 5-ти из 11-ти линий «Дуняши» (№44, 62, 65, 67, 374), у 2-х из 5-ти линий «Зерена» (№119 и №336), у 3-х из 5-ти линий «Альбинки» (№39, 46 и 48), все 4 проверенные линии сорта «Пикассо» (№192, 194, 257, 351) и по одной у линий, полученных на основе «Санта» (№295) и «Кормилица» (№103). Одиночное заражение обнаружено в одной из 11-ти линий «Дуняши» (№293) и в одной из 3-х линий «Фортуны» (№309). У 3-х из 5-ти линий сорта «Зерен» (№38, 59 и 344) выявлена двойная инфекция PVS и PVY, а в одной из 5 линий «Альбинки» (№74) была обнаружена тройная комплексная инфекция PVS, PVM и PVY (Таблица 3.6). Таким образом, 3-летние полевые испытания

показали развитие устойчивости у трансформантов как к PVS, так и к PVM, но не к PVY. Десять из 22 линий, проявлявших устойчивость как к PVS, так и к PVM, несли в своем геноме рекомбинантную ДНК S-25K-AS, а 8 и 4 из этих 22 линий были трансформированы конструкциями AS-CP-S и AS-25K-S, соответственно. С трансгеном S-CP-AS не было получено ни одной устойчивой к карлавирусам линии (Таблица 3.6).

Подход с использованием природного механизма РНКи, опосредованного влиянием трансгена в культуре тканей оказался эффективным для последовательно-специфической элиминации как целевого (PVS), так и нецелевого (PVM) вирусов естественно инфицированных сортов картофеля с последующей резистентностью к этим двум карлавирусам в полевых условиях в течение 3-х лет полевых испытаний.

3.4 Молекулярные доказательства трансген-опосредованной РНК-интерференции

3.4.1 Блот-гибридизация малых РНК

Следует отметить, что в результате экспрессии интрон-шпилечной трансгеной ДНК (трансгена) и работы РНКи наблюдалось образование малых РНК (микроРНК или миРНК), часть из которых относилась к группе коротких интерферирующих РНК (киРНК). В то же время, присутствие вирусной инфекции в клетке всегда запускает образование вирус-опосредованных киРНК (vsiРНК, как молекулярный маркер заражения), являющиеся продуктом иммунного ответа клетки растения на инфицирование [274]. Поэтому, трансген-опосредованные миРНК далее были обозначены именно как миРНК, а продукты РНКи, направленные против вирусных инфекций как киРНК.

Для доказательства влияния трансгенной ДНК-конструкции на запуск естественного процесса РНКи и последующей элиминации карлавирусов, а также устойчивости к заражению трансформантов, был проведен молекулярный анализ препаратов тотальных РНК (northern-блот гибридизация) перспективных трансгенных линий картофеля по итогам 3-летних полевых испытаний. Для этого выделенные из листовых пластинок картофеля препараты тотальных РНК семи трансгенных (№119, пробирочное растение 119 (*in vitro*), 279, 61, 65 и 103) и пяти контрольных растений (Зерен (родительская линия), Милена (род.), Дуняша (род.), Фортуна (род.) и Ушконыр (исходная линия)) были разделены в 15% ПААГ в денатурирующих условиях, осуществлен перенос на нейлоновую мембрану и проведена гибридизация РНК с радиоактивно-меченными (³²P) пробами к кодирующим последовательностям 25K PVS и miR160. Результаты блот-гибридизации РНК картофеля приведены на Рисунке 3.21.

В результате гибридизации разделенных в 15% ПААГ тотальных РНК с PVS_25K_s пробой установлено, что только в пяти образцах картофеля: №119 (дорожка 2), №119 (*in vitro*) (дорожка 3, в минимальных количествах), №61 (дорожка 7), №61 (дорожка 8, растение с признаками заражения PVY по листовой пластинке), а также №103 (дорожка 11) наблюдалось образование фрагментов РНК, размерами 24 и 21-22 нт, соответствующим миРНК (Рисунок 3.21, Б). Линия 119 (*in vitro*), свободная от вирусной инфекции по результатам

ИФА, накапливала более низкие уровни миРНК, чем полевые растения линий №119 (зараженный только PVY), №61 и №103 (свободные от вирусной инфекции, Таблица 3.6), все из которых несут один и тот же трансген S-25K-AS. vsiРНК, образованные от инфекции PVS, в нетрансформированных растениях Зерен, Фортуна и Ушконыр были ниже уровня обнаружения (Рисунок 3.21, дорожка 1, 10 и 12, соответственно). При этом, все образцы РНК гибридизовались с контрольной пробой к miR160, что доказывает высокое качество блот-переноса разделенных фрагментов РНК на нейлоновую мембрану, а также гибридизационных растворов и условий проведения гибридизации. Таким образом, всего 3 линии трансгенных линии картофеля показали присутствие миРНК PVS: №119 (на основе сорта «Зерен»), №61 («Дуняша») и №103 («Кормилица»), опосредованные экспрессией трансгенной вставки.

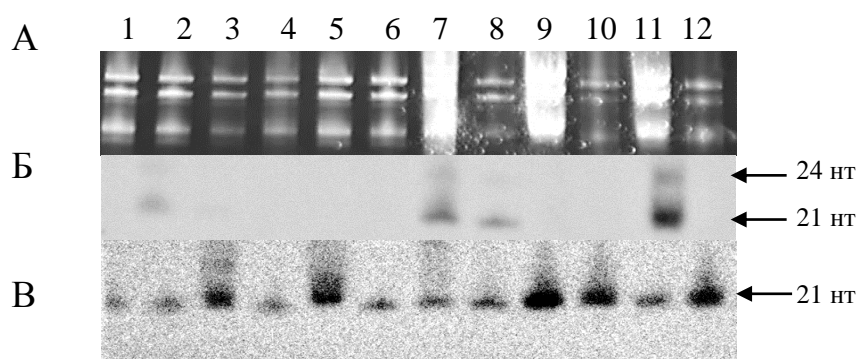


Рисунок 3.21 – Результаты электрофореза (А) в 15% ПААГ в денатурирующих условиях (окрашивание геля выполнено бромидом этидия) и блот-гибридизация тотальных РНК картофеля с радиоактивно-меченными пробами PVS_25K_s (Б) и miR160_as (В). 1 – Зерен (род.), 2 – №119, 3 – №119 (*in vitro*), 4 – Милена (род.), 5 – №279, 6 – Дуняша (род.), 7 – №61 (без признаков вирусной инфекции), 8 – №61 (присутствовала симптоматика заражения PVY по листовой пластинке), 9 – №65, 10 – Фортуна (род.), 11 – №103, 12 – Ушконыр (исход.). Описание линий приведено в Таблице 3.5.

3.4.2 Анализ секвенирования Illumina тотальных РНК трансгенных растений

Тотальные экстракты РНК трех трансгенных полевых линий картофеля (№119, 61 и 103), пробирочного растения №119 (*in vitro*) (пробирочный вариант линии №119, оздоровленный от трех вирусов по показаниям ИФА) и контрольного растения Зерен (зараженный PVS+PVY) были использованы для секвенирования Illumina РНК и реконструкции компонентов вирусных инфекций, присутствующих в образцах. Каждому образцу РНК в процессе секвенирования и последующей компьютерной обработки данных были присвоены следующие названия: Зерен (полевое растение) – ALYU-75, №119 (полевое растение) – ALYU-76, №119 (*in vitro*) – ALYU-77, №61 (полевое

растение) – ALYU-78, №103 – ALYU-79. При секвенировании миРНК трансгенных вариантов картофеля и контрольного растения считывания последовательностей компонентов вирусных инфекций сравнивались с последовательностями вируса PVS (как целевой вирус, против которого была направлена трансген-опосредованная РНКи), так и с последовательностями вируса PVY – как неродственный к целевому. С вирусом PVM результаты расшифровки миРНК трансформантов картофеля не сравнивались.

Для реконструкции компонентов вирусных инфекций, присутствовавших в каждом образце препаратов РНК, был использован ранее разработанный биоинформатический «конвейер» для сборки вирусных геномов *de novo* из считанных последовательностей кРНК [252, 253]. По результатам секвенирования РНК были составлены библиотеки считываний (Таблица 3.7). В результате были реконструированы полные геномные последовательности вирусов PVS и PVY, присутствовавшие в препаратах РНК контрольного полевого растения ALYU-75 и двух полевых трансгенных линий картофеля №119 (ALYU-76) и №103 (ALYU-79). Изолят PVS, реконструированный из ALYU-75 (депонирован в NCBI Genbank под номером ON583978) был на 98,4% идентичен изоляту PVS «Fortune» (MK442089), сходному с последовательностью вируса PVS, использованного для получения трансгенных интрон-шпилечных ДНК и трансформации картофеля. Изоляты вируса PVY из ALYU-75 (ON583979) и ALYU-79 имели 100% идентичность друг с другом (на 99,9% были идентичны изоляту JF927753 из Польши) и 98,7% сходства с изолятом PVY из ALYU-76 (ON583980), а также 99,8% гомологии с JF927754 (Германия). Из двух вариантов трансгенных растений – №61 (ALYU-78) (освобожденного от вируса PVM) и пробирочной линии №119-ALYU-77 (*in vitro*) (оздоровленной от тройной комплексной инфекции PVS+PVY+PVM) вирусы PVS и PVY не реконструировались. Таким образом, у трех секвенированных образцов картофеля была детектирована комплексная вирусная инфекция PVS+PVY – Зерен (ALYU-75), №119 (ALYU-76) и №103 (ALYU-79), что не согласуется с результатами ИФА (Таблица 3.6). Расхождение в результатах ИФА и секвенирования РНК можно объяснить тем, что PVY мог ускользнуть от обнаружения ИФА в момент времени отбора проб в полевых условиях, но наиболее вероятно, что трансген-опосредованная РНКи воздействовала не только на PVS, но и на PVY, тем самым помогая растению справиться с вирусным заражением естественным образом и препятствуя синтезу вирусных белков.

Сравнение количества считанных миРНК из общей массы растительных миРНК картофеля позволило установить, что уровень экспрессии интрон-шпилечной рекомбинантной ДНК (миРНК, образованные в результате экспрессии трансгена, обозначены в дальнейшем как PVS-РНКи) в трансгенных линиях значительно варьировал (что согласуется с результатами northern-блота, Рисунок 3.21). В значительной степени преобладали классы миРНК размером 20-22 нт по сравнению с 23-25 нт (Рисунок 3.22, А). Наибольшее количество PVS-РНКи наблюдалось в образцах, выделенных из растений линий №61 (ALYU-78) и №103 (ALYU-79), причем преобладал класс миРНК, размером 21 нт (12,85% и

9,65%, соответственно). У полевого и пробирочного растений линии №119 (ALYU-76 и ALYU-77) наблюдался примерно одинаковый уровень накопления PVS-РНК и составлял 0,86% и 0,94%, соответственно, от уровня экспрессии растительных миРНК, для класса миРНК размером 21 нт.

Таблица 3.7 – Классификация и количество считанных миРНК полученных в результате секвенирования препаратов РНК трансгенных и контрольного растений картофеля и использованных для дальнейшей реконструкции компонентов вирусных инфекций.

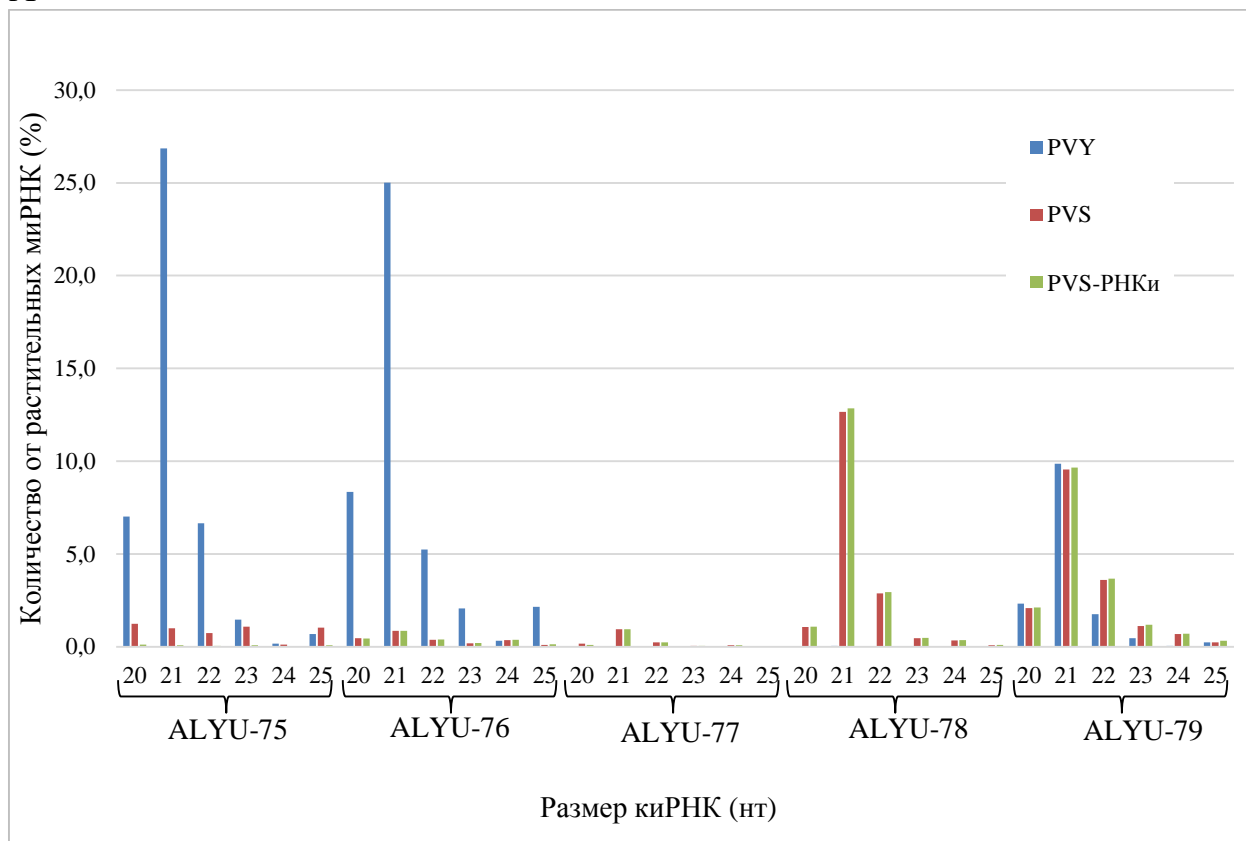
Категория	Количество считываний				
	ALYU-75	ALYU-76	ALYU-77	ALYU-78	ALYU-79
Общее число 1-50 нт считываний	35,869,294	35,723,314	33,830,699	31,627,721	35,229,577
Общее число 20-25 нт считываний	29,418,323	29,952,043	25,122,149	24,088,130	28,946,482
Нормализованное число 20-25 нт считываний	1,000,000	1,000,000	1,000,000	1,000,000	1,000,000
Общее число полногеномных считываний для <i>S. tuberosum</i>	673,359	686,645	793,697	718,924	694,676
Общее число считываний для вируса PVY	130,403	155,190	87	86	36,698
Общее число считываний для вируса PVS	6,617	1,619	454	5,332	6,042
Общее число считываний для трансгена (PVS-РНК)	172	6,066	3,870	38,880	42,063

У растений линии №119 (ALYU-76 и ALYU-77), как и у контрольного варианта Зерен (ALYU-75), были обнаружены низкие уровни накопления киРНК PVS – 0,85%, 0,94% и 0,98%, соответственно для киРНК класса 21 нт. Однако, для контрольного образца были характерны более высокие уровни накопления PVS вирус-опосредованных киРНК для классов: 20 нт – 1,22%, 22 нт – 0,73%, 23 нт – 1,08%, 25 нт – 1,03% и следовые количества класса 24 нт киРНК (Рисунок 3.22, А).

Уровень накопления киРНК различного размера зависит от связывающихся с ними в процессе ассоциации RISC-комплекса белками AGO для последующего узнавания и деградции вирусных РНК в процессе РНКи. У картофеля было идентифицировано 14 вариантов AGO-подобных белков [279]. Поскольку у трансгенных растений наблюдалось резкое преобладание киРНК класса 21 нт, можно сделать вывод о том, что высокий уровень накопления как трансген-опосредованных PVS-РНК, так и вирус-опосредованных киРНК PVS

связан с взаимодействием ксРНК с большой группой белков AGO: AGO1 (предпочтительно связывается с 21 и 24 нт классами миРНК), AGO2 (связывается с классом 21 нт), AGO4 (21 и 24 нт) и AGO5 (21, 22 и 24 нт) [155, 161].

А



Б



В

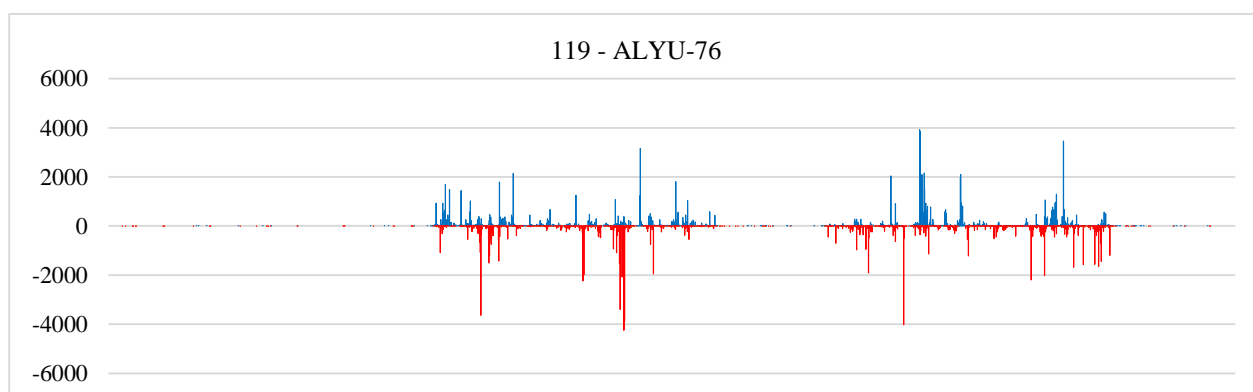


Рисунок 3.22, лист 1 – Результаты компьютерной обработки данных, полученных секвенированием Illumina препаратов РНК картофеля. А – Сравнение количества считанных миРНК и их размеров в трансгенных линиях и контрольном растении картофеля по результатам секвенирования Illumina. Б – Схематическое изображение организации экспрессионной кассеты трансгена. В – Карты однонуклеотидного разрешения трансген-опосредованных миРНК.

Полосы над осью представляют смысловые (прямые) чтения, начиная с каждой соответствующей позиции; приведенные ниже представляют собой антисмысловые (обратные) чтения, заканчивающиеся в соответствующей позиции [251].

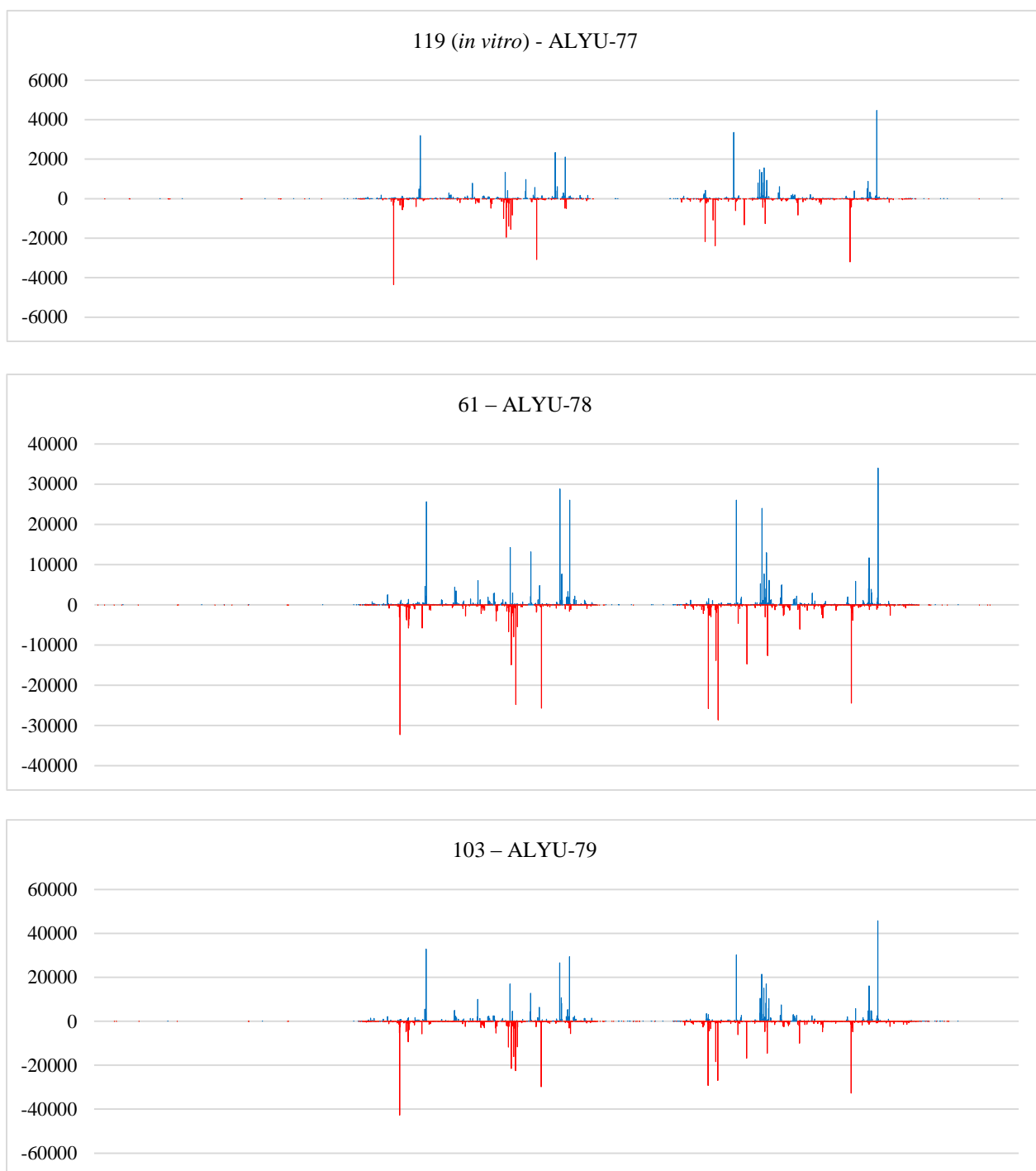


Рисунок 3.22, лист 2.

Помимо трансген-опосредованных PVS-РНКи и вирус-опосредованных киРНК PVS в результате реконструкции компонентов вирусного заражения у трех вариантов растений (ALYU-75, ALYU-76 и ALYU-79) было отмечено присутствие PVY-опосредованных киРНК (Рисунок 3.22, А), хотя согласно

показаниям ИФА, растение линии №103 (ALYU-79) было свободным от вирусных инфекций (Таблица 3.7). Количество PVY киРНК значительно преобладало над эндогенными PVS-РНКи и киРНК PVS, при этом преобладали также классы 20-22 нт киРНК, по сравнению с группой классов 23-25 нт киРНК. Класс 21 нт киРНК PVY доминировал и составлял: 26,86%, 25,01% и 9,87%, соответственно. В двух образцах растительных РНК (ALYU-77 и ALYU-78) киРНК PVY полностью отсутствовали, что говорило об отсутствии вирусной инфекции PVY в этих пробах. Следует отметить, что уровень трансген-опосредованных PVS-РНКи и PVS-/PVY-опосредованных киРНК класса 21 нт у картофеля линии №103 (ALYU-79) был приблизительно одинаков – 9,6%, 9,5% и 9,8%, соответственно. Из этого следует, что высокий уровень экспрессии трансгена (PVS-РНКи) вел не только к устойчивости к заражению карлавирусами, но также обеспечивал устойчивость к неродственному вирусу PVY у этой линии картофеля.

Контиги (набор перекрывающихся сегментов ДНК, которые в совокупности представляют собой консенсусную (каноническую) область ДНК) миРНК, представляющие собой полную или почти полную кодирующую последовательность PVS 25K, полученные из киРНК, экспрессированных с интрон-шпилечной рекомбинантной ДНК 25K PVS, были реконструированы для всех четырех образцов трансгенных растений. Чтобы понять биогенез и функцию миРНК, полученных в результате экспрессии трансгена, был проведен биоинформатический анализ размера, полярности, 5'-нуклеотидной идентичности и профилей горячих точек по сравнению с соответствующими профилями PVS и PVY вирус-опосредованных киРНК, и миРНК растений (Рисунок 3.22, Б и В).

Избыточные считывания миРНК, размерами 15-34 нт, полученные секвенированием Illumina препаратов тотальной РНК из образцов листьев трансгенных линий картофеля ALYU-76, ALYU-77, ALYU-78 и ALYU-79 были картированы на эталонную последовательность трансгенной экспрессионной кассеты с нулевыми несовпадениями (Рисунок 3.22, Б и В); карты миРНК с однонуклеотидным разрешением были созданы с использованием компьютерной программы MISIS-2 [253]. На гистограммах приведено количество прочтений миРНК длиной 15-34 нт в каждом нуклеотидном положении экспрессионной кассеты трансгена размером 2743 нт (Рисунок 3.22, Б). Полосы над осью представляли смысловые (прямые) чтения, начиная с каждой соответствующей позиции, приведенные ниже – антисмысловые (обратные) чтения, заканчивающиеся в соответствующей позиции. Над гистограммами приведена схема организации экспрессионной кассеты трансгена: промотор 35S CaMV, инвертированные повторы кодирующей последовательности 25K PVS, разделенные интроном и терминатор транскрипции *nos*.

Анализ карт данных однонуклеотидного разрешения и количества миРНК размером 15-34 нт показал, что в каждом из четырех образцов трансгенных растений трансген-опосредованные миРНК (PVS-РНКи), продуцировались почти исключительно из инвертированных повторов кодирующей

последовательности 25K PVS и принадлежали преимущественно к классу 21 нт, за которым следовали менее распространенные классы 22 и 24 нт (Рисунок 3.23). Эти данные полностью совпадали с результатами блот-гибридизации тотальных РНК трансгенного картофеля (см. Рисунок 3.21). Для каждого из трех основных размерных классов смысловые и антисмысловые миРНК были одинаково распространены (см. Рисунок 3.23). Профили горячих точек (пиков) смысловой и антисмысловой миРНК существенно различались и зеркально отражали друг друга в двух перевернутых повторах (см. Рисунок 3.22, В). Это связано с тем, что инструмент картирования BWA случайным образом распределяет избыточные считывания миРНК, полученные из восходящих и нисходящих ветвей шпильчатой РНК между двумя повторами.

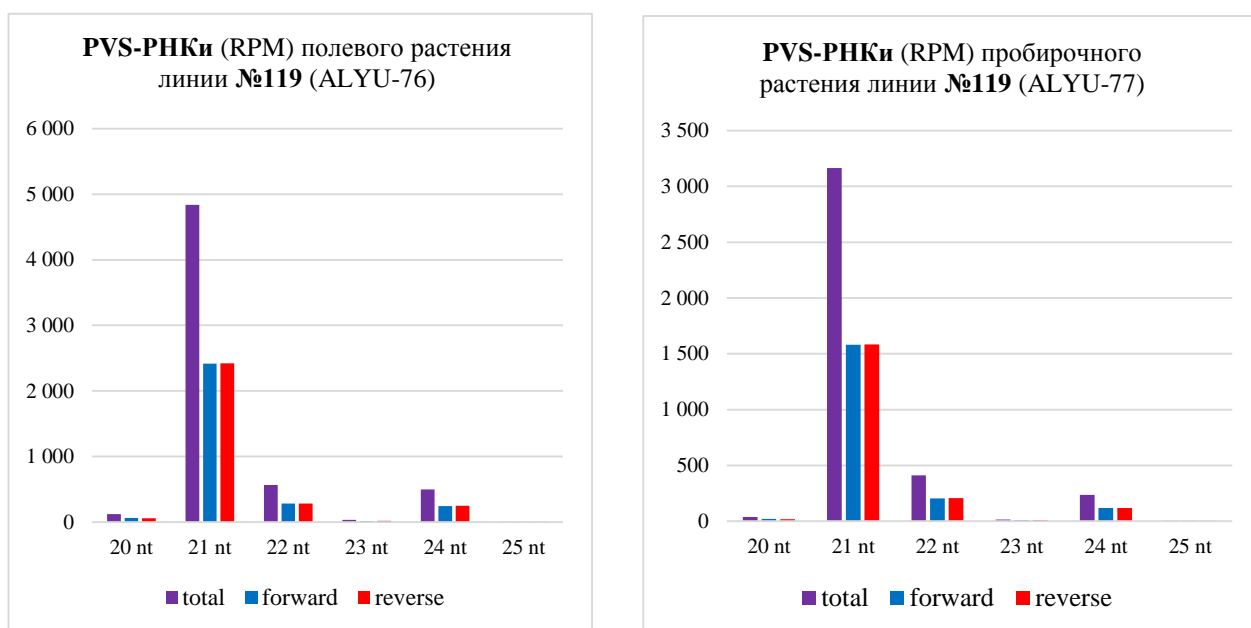


Рисунок 3.23, лист 1 – Профили размеров и полярности миРНК, полученных из трансгена (PVS-РНКи). Избыточные чтения миРНК, размерами 20-25 нт (nt), картированные на экспрессионную часть кассеты трансгена с нулевыми несовпадениями, сортированы по размеру (20-25 нт) и полярности (total – общее число, forward – прямое, reverse – обратное) и подсчитаны в считываниях на миллион (RPM) всего 20-25 операций чтения в каждой библиотеке [251].

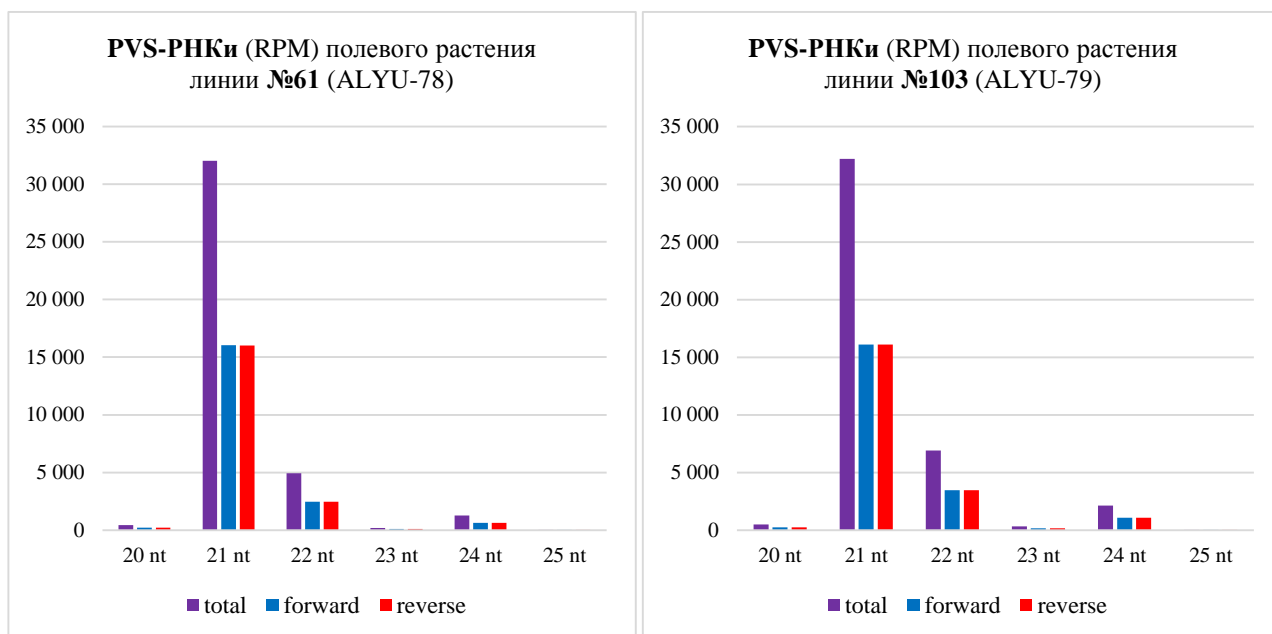
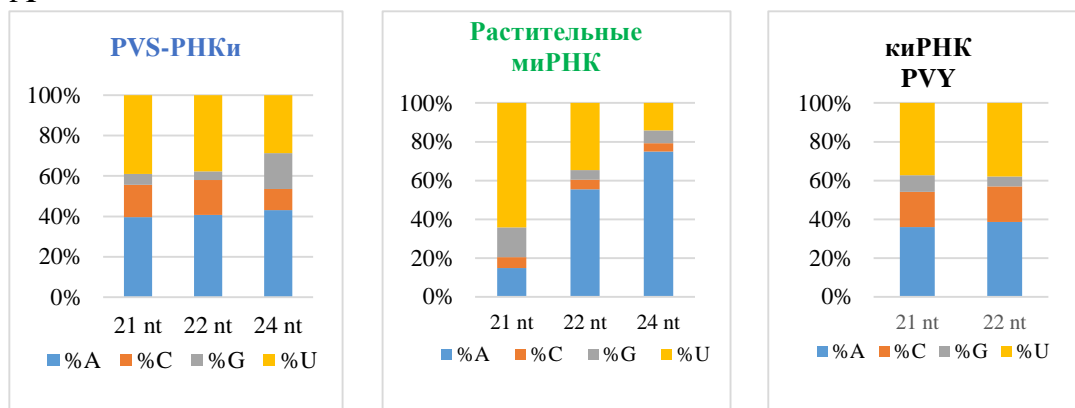


Рисунок 3.23, лист 2.

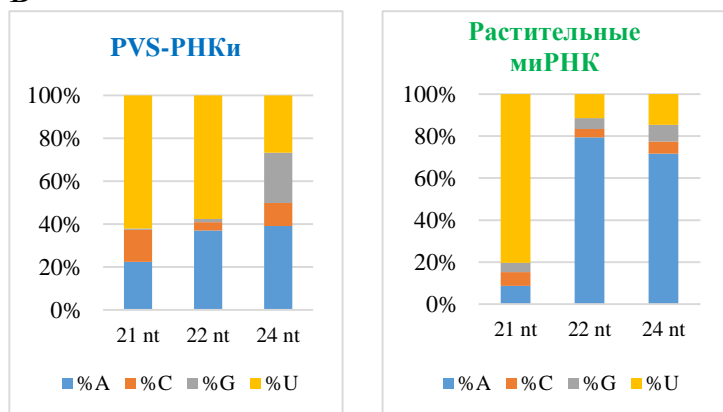
Анализ идентичности 5'-концевых нуклеотидов трансгенных миРНК показал, что классы 21 и 22 нт обогащены 5'U (от 39 до 76%), за которыми следуют 5'A (от 14 до 41%) и 5'C (от 4 до 17%) (Рисунок 3.24), предполагая их ассоциацию с AGO1-, AGO2- и AGO5-подобными белками картофеля, соответственно, как было ранее установлено на модельных растениях [280]. В то же время, миРНК класса 24 нт обогащены 5'A (от 39 до 44%) и 5'U (от 27 до 39%), что указывает на их связь с AGO4-подобными и другими AGO белками, подлежащими идентификации, соответственно. Следует особо отметить, что для трансген-опосредованных миРНК относящихся к классу 21 нт было характерно преобладание 5'U, что практически было близко с классом 21 нт с незначительным превалированием растительных миРНК (39 против 64% для ALYU-76; 62 против 80% для ALYU-77; 68 против 81% для ALYU-78; 62 против 79% для ALYU-79). Однако, при сравнении двух других преобладающих миРНК классов 22 и 24 нт у растительных миРНК наблюдается увеличение количества 5'A, в то время как для PVS-RNKi этих же классов оставались преобладающими 5'U-концевые миРНК (см. Рисунок 3.24).

Для PVY-опосредованных киРНК наблюдалось четкое превалирование двух групп 5'A- и 5'U-концевых киРНК. Так, количественно соотношение классов 21 и 22 нт с 5'A составляло 36 и 39% для ALYU-76, 35 и 36% для ALYU-78, 36 и 38% для ALYU-75, предполагая их ассоциацию с AGO1-, AGO2-подобными белками картофеля. В то же время, для группы 5'U тех же классов значения варьировали на уровне 37 и 38%, 39 и 42%, 38 и 41%, соответственно. Для киРНК PVY наблюдалось значительное количество 5'C киРНК на уровне 18-19% для классов 21 и 22 нт, что указывало на слабое участие AGO5-подобного белка в процессе РНКи.

А



Б



В

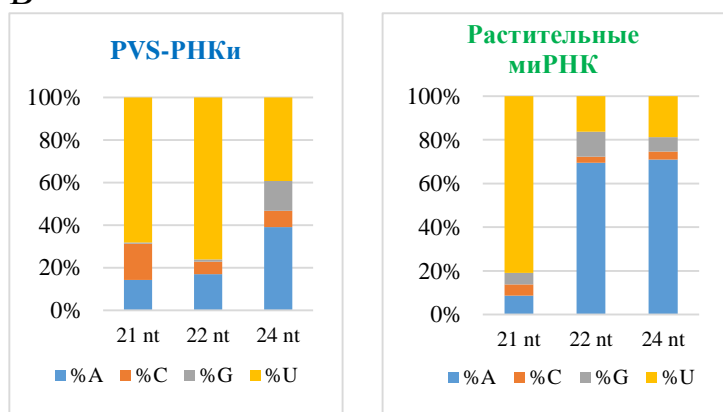
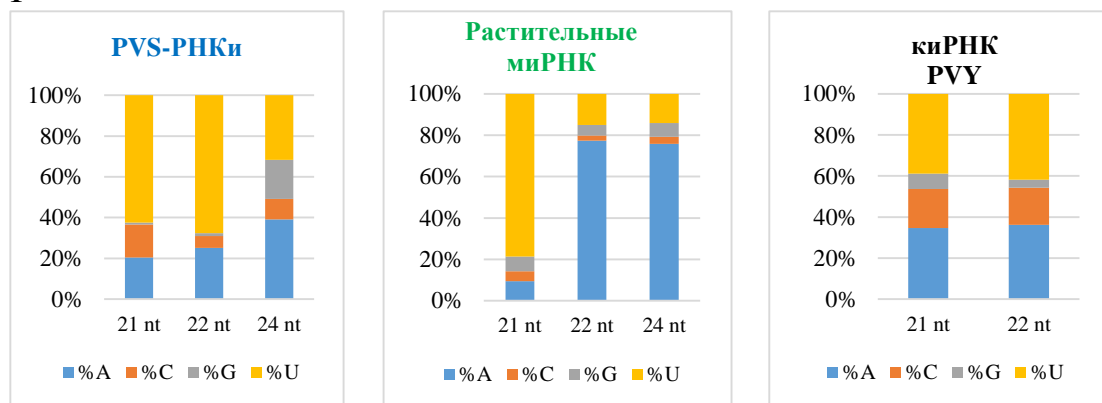


Рисунок 3.24, лист 1 – Профили распределения 5'-концевых нуклеотидов, построенные для основных размерных классов трансгенных, растительных и вирусных миРНК, полученные на основе данных секвенирования миРНК трансгенного картофеля. Варианты растений: А – ALYU-76; Б – ALYU-77; В – ALYU-78; Г – ALYU-79; Д – ALYU-75 [251].

Г



Д

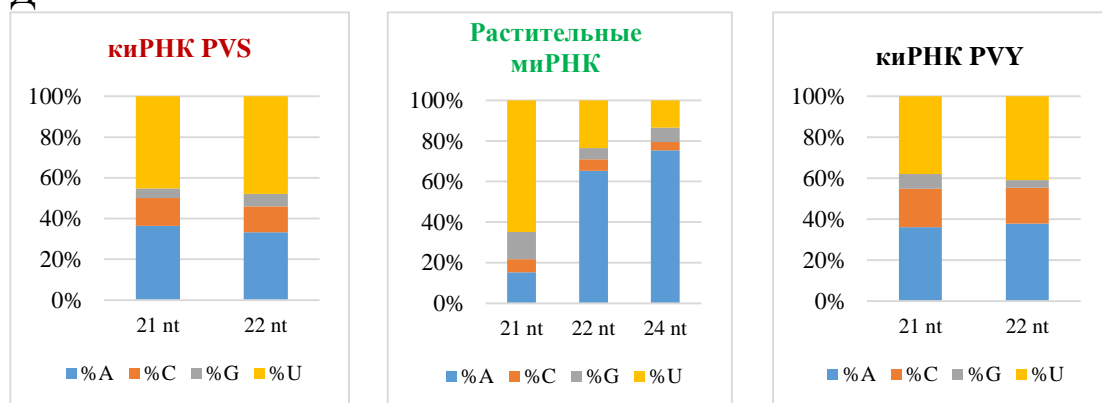


Рисунок 3.24, лист 2.

Основываясь на этих результатах, можно предположить, что 25K PVS инвертированные повторяющиеся производные классов 21, 22 и 24 nt миРНК (PVS-РНКи) процессировались соответственно белками DCL4, DCL2 и DCL3 из шпилечной структуры дцРНК сплайсированных и/или несплайсированных транскриптов Рол II [281-285], а затем связывались с несколькими белками АГО для нацеливания на комплементарные вирусные РНК и тем самым препятствовали вирусной инфекции [286]. Незначительные количества миРНК, экспрессированные с трансгена за пределами инвертированных повторов 25K PVS (т.е. из областей промотора 35S, интрона и *nos*-терминатора), указывали на ограниченное участие РНК-зависимой РНК-полимеразы в продукции вторичных миРНК и на транскрипционный сайленсинг, который объясняет устойчивую продукцию трансгенных миРНК в течение трех лет полевых испытаний и их стойкий защитный эффект. Это согласуется с результатами полевых испытаний трансгенных растений томата с интрон-шпилечной РНК, которые проявляли иммунитет к вирусу желтой курчавости листьев томата (род *Begomovirus*) [281]. Анализ 15-34 nt миРНК в нетрансформированном растении Зерен (ALYU-75), коинфицированном PVS и PVY, показал, что вирусные киРНК происходили из обеих цепей полных геномов PVS и PVY и принадлежали преимущественно к классу 21 nt и менее распространенному классу 22 nt, продуцируемому DCL4 и DCL2, соответственно, в то время как классы других размеров накапливались на

более низких уровнях и происходили, в основном, из смысловой нити (см. Рисунки 3.22 и 3.23, Рисунок 3.25), что предполагает их продукцию по DCL-независимому пути распада РНК. Аналогичные результаты были получены для РВУ киРНК, накапливающихся в трансгенных (ALYU-76 и ALYU-79) растениях (Рисунок 3.26, Б и Д).



Рисунок 3.25, лист 1 – Карты однонуклеотидного разрешения вирусных киРНК нетрансформированного растения Зерен (ALYU-75), инфицированного PVS, и миРНК трансгенных растений, не содержащих PVS, картированные на геном PVS [251].

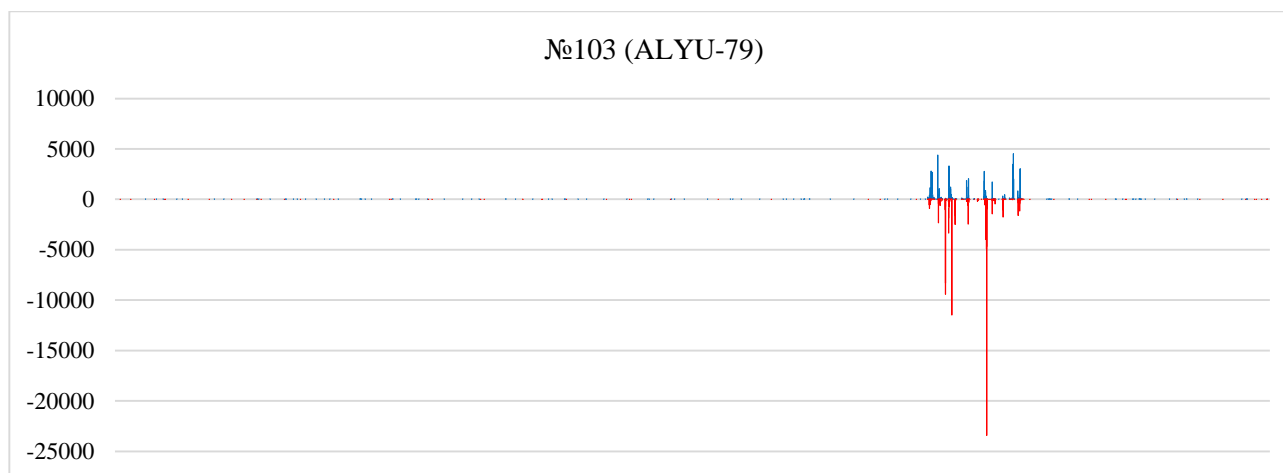
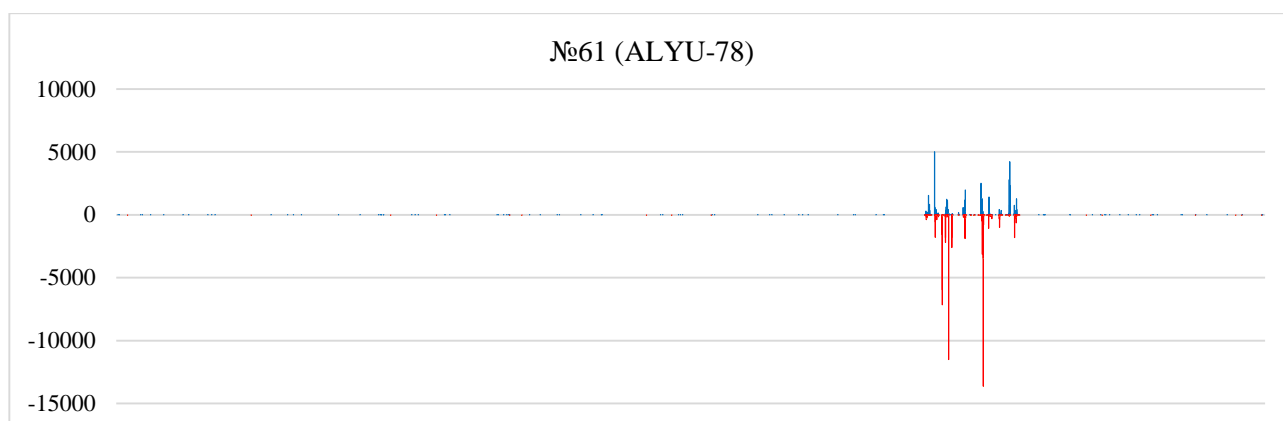
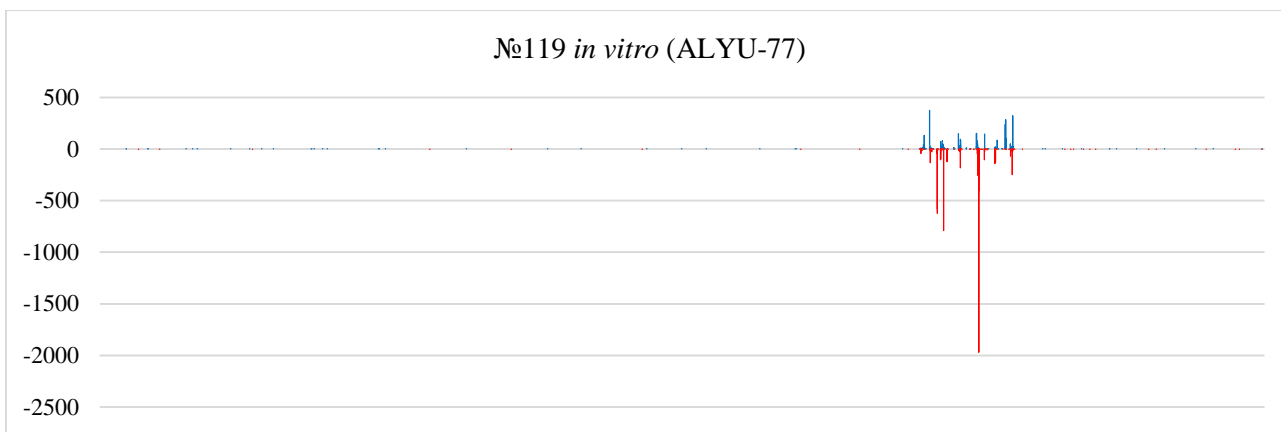
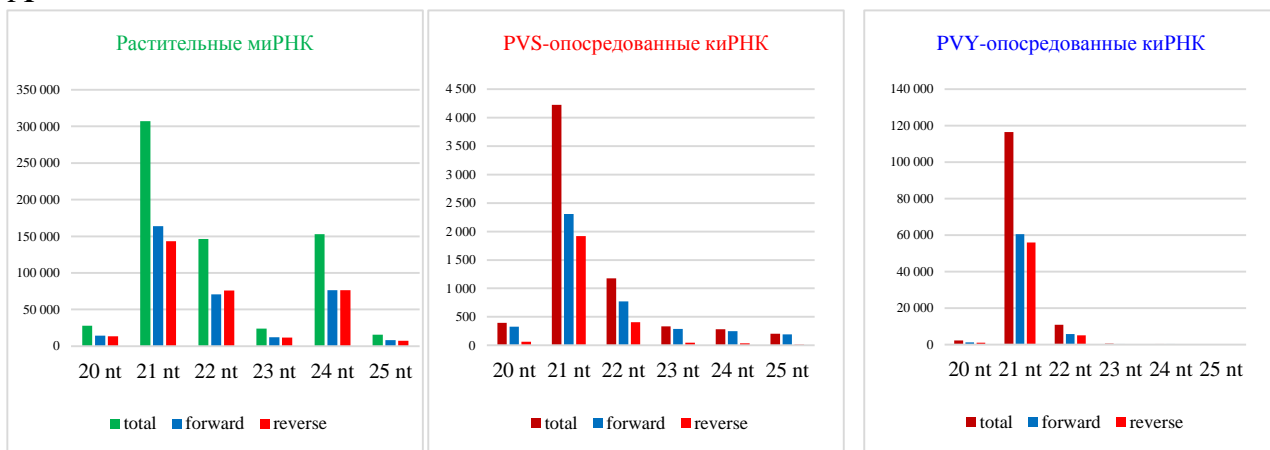


Рисунок 3.25, лист 2.

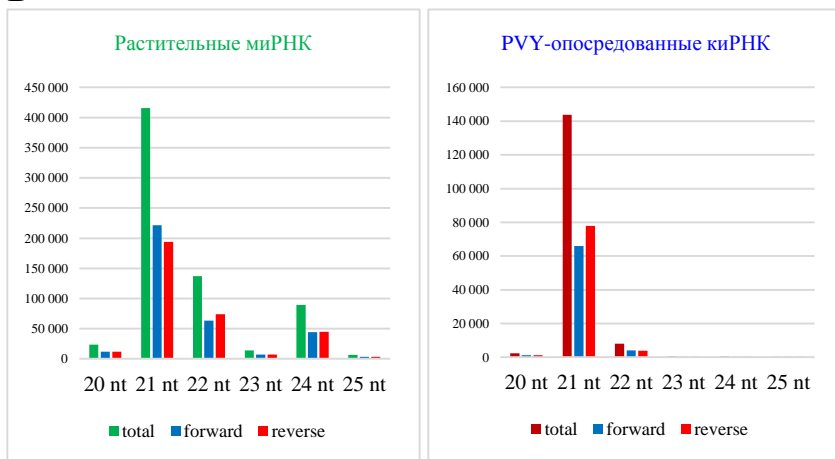
Картирование мРНК трансгенных растений (ALYU-76, ALYU-77, ALYU-78 и ALYU-79) на геном PVS, реконструированный из нетрансгенного растения Зерен (ALYU-75), показало, что они соответствуют исключительно кодирующей последовательности 25К PVS (Рисунок 3.25), что подтверждает их трансгенное происхождение и отсутствие инфекции PVS в трансгенных растениях. 732-нуклеотидные кодирующие последовательности 25К PVS, присутствовавшие в трансгене и изоляте PVS ALYU-75, различались по 32 положениям SNP

(однонуклеотидный полиморфизм). От 15 до 25% трансген-опосредованных миРНК длиной 20-25 нт, картированных с эталонной последовательностью PVS ALYU-75 содержали нулевые несовпадения, и почти 100% этих миРНК были картированы с той же эталонной последовательностью, когда допускается до 2 несоответствия. Это указывало, что PVS-РНКи обладали достаточной гомологией для специфичной к нуклеотидной последовательности РНКи, нацеленной на этот конкретный изолят PVS, а также на другие генетические варианты этого вируса, при условии, что сохраняется достаточная гомология в их 25К-кодирующей области. Примечательно, что подсчеты PVS-РНКи в линии №119 из поля (ALYU-76) и вирусных киРНК, считанных с полного генома PVS, из нетрансформированного полевого растения Зерен (ALYU-75) были сопоставимы: 6617 и 6066 прочтений на миллион (RPM) от общего количества миРНК размером 20-25 нт (т.е. 0,66 и 0,61% от общего количества миРНК) (Рисунок 3.26).

А



Б



В

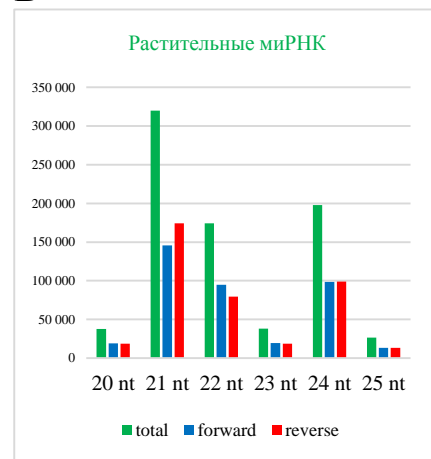


Рисунок 3.26, лист 1 – Профили размеров растительных и вирусных миРНК (RPM) А – ALYU-75, Б - ALYU-76, В - ALYU-77, Г - ALYU-78, Д - ALYU-79 [251].

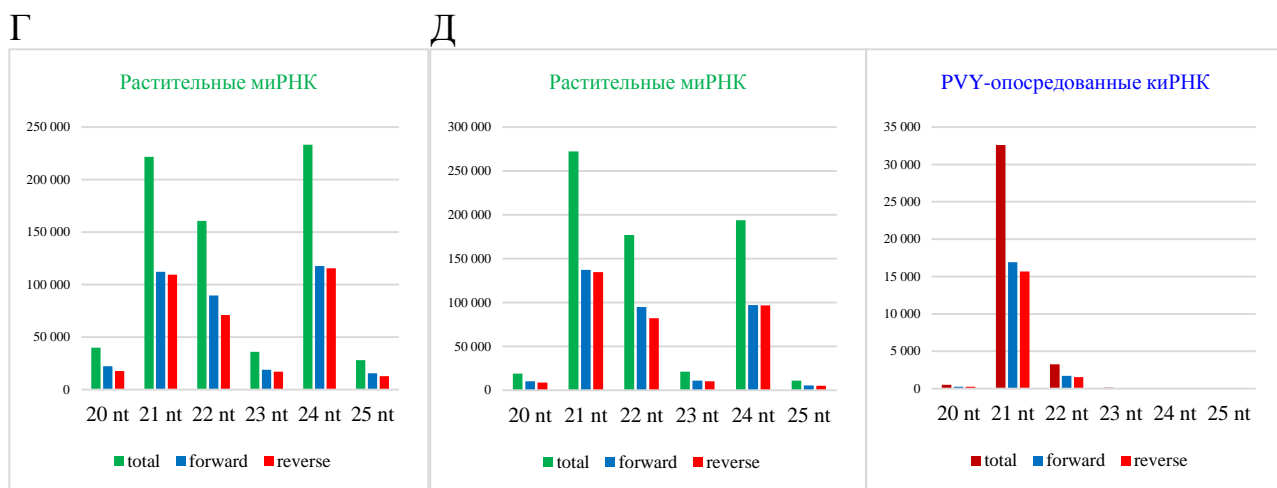


Рисунок 3.26, лист 2.

Учитывая, что последовательность инвертированных повторов 25К PVS размером 732 нт в трангене составляет всего 8,6% от длины генома PVS (8500 нт), скорость продукции трангенных миРНК примерно в 11 раз выше, чем скорость продукции вирусных миРНК из области-мишени PVS. Это демонстрировало высокий потенциал трангена, экспрессирующего интрон-шпилечную РНК в усилении естественной противовирусной РНКи и объясняло, как элиминацию вируса, так и последующую устойчивость трангенных растений к новым карлавирусным инфекциям.

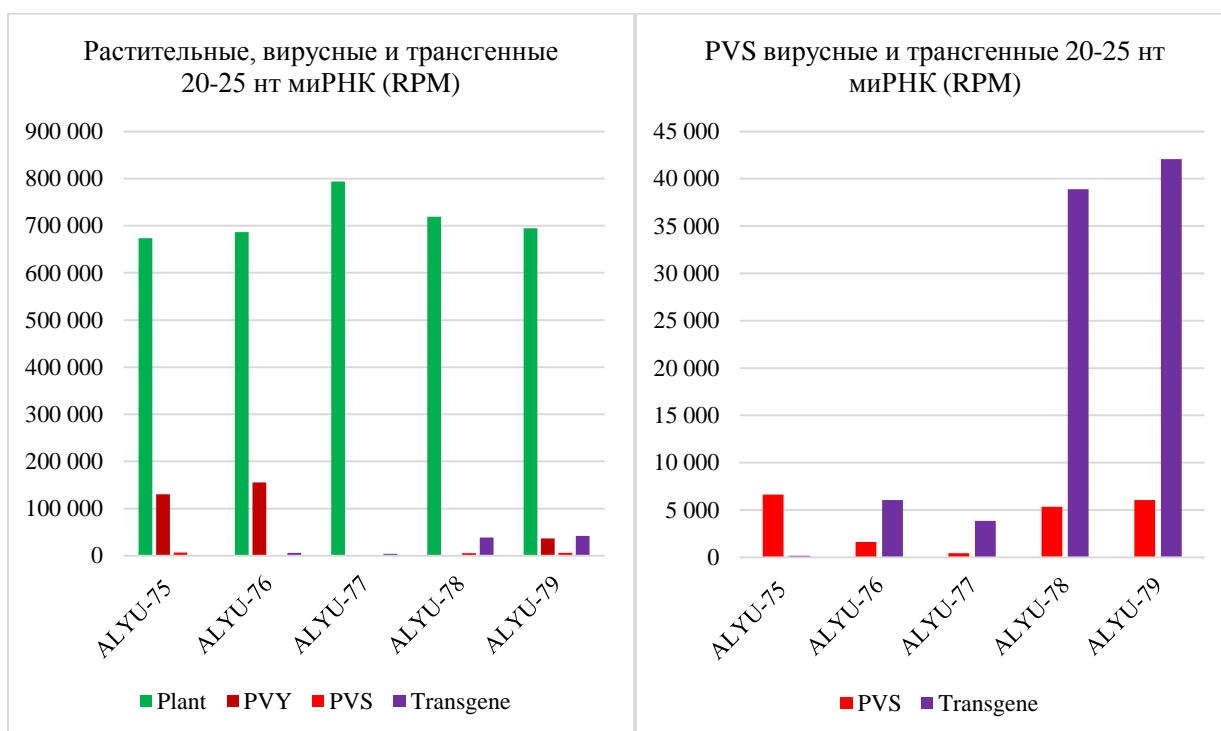


Рисунок 3.27 – Относительное количество растительных, вирусных и трангенных миРНК [251].

В соответствии с результатами блот-гибридизации миРНК, пробирочная трансгенная линия № 119 накапливала меньшее количество киРНК трансгенного происхождения (0,38% от общего количества), чем полевые потомки этой линии, тогда как полевые потомки трансгенных линий №61 и №103 накапливали более высокие количества киРНК трансгенного происхождения (3,9 и 4,2%, соответственно). Поскольку линия № 61 была свободна от вирусного заражения, а линия №103 инфицирована PVY, инфекция PVY, по-видимому, не мешала продукции киРНК, полученным из трансгена, несмотря на то, что уровни накопления вирусных PVY киРНК, намного выше, чем у PVS киРНК и PVS-РНКи (Рисунок 3.27). Имеются данные о высокой распространенности потивирусных миРНК [159, 252], что потенциально может быть объяснено высокой репликацией и тканевой тропностью потивирусов и/или стабилизирующим миРНК эффектом потивирусного сайленсинг-супрессора HC-Pro, который связывается и секвестрирует вирусные киРНК [159]. Результаты полевых испытаний с длительной устойчивостью некоторых трансгенных линий к PVS и/или PVM даже в присутствии PVY указывают на то, что активность связывания киРНК HC-Pro PVY не подавляет защитное действие трансген-опосредованных миРНК против карлавирусов. Тем не менее, нельзя исключать, что инфекция PVY или другие биотические (или абиотические) факторы могут потенциально мешать действию киРНК трансгенного происхождения, особенно в тех линиях, где скорость их продукции недостаточно высока. Это может объяснить, почему некоторые линии трансформантов, выведенные от карлавирусной инфекции, в последующем были повторно инфицированы PVS и/или PVM (Таблица 3.6). Вывод о том, что трансгенные интрон-шпилечные РНК обладают оздоравливающим и защитным действием не только против целевого карлавируса PVS, но и против нецелевого карлавируса (PVM), согласуется с результатами ранее опубликованного исследования, в котором одна из линий огурца экспрессировала самые высокие количества 21, 22 и 24 нт трансгенных производных интрон-шпилечной РНК, где образующиеся киРНК приводили к устойчивости к инфекциям как целевого потивируса, так и двум нецелевым потивирусам, которые имели 67% и 63% идентичности к последовательности трансгена [282]. Анализ 22 изолятов PVM, доступных в NCBI GenBank, показал, что большинство из этих изолятов имеют по крайней мере две последовательности >21 нт с достаточной идентичностью с трансгенной последовательностью 25К PVS для последовательно-специфического расщепления РНК PVM с помощью полученных киРНК, экспрессированных с соответствующих последовательностей трансгена. По сравнению с 25К, последовательности CP изолятов PVM слишком отличались от последовательности трансгена CP PVS, чтобы предсказать их последовательно-специфическое расщепление трансгенными миРНК, хотя нельзя исключить ингибирование трансляции миРНК CP PVM посредством комплементарного взаимодействия трансгенных киРНК с гомологичными вирусными РНК последовательностями.

Таким образом, было доказано, что трансгенные линии картофеля №119, 61 и 103 обладали молекулярной устойчивостью к заражению PVS посредством

трансген-опосредованной продукции киРНК. Оздоровляющий эффект на растения также был связан с экспрессией интрон-шпилечной РНК. В целом, можно заключить, что использование интрон-шпилечных последовательностей вируса способно вызывать длительный иммунитет к вирусному заражению посредством продукции киРНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа посвящена изучению молекулярных особенностей вируса PVS, его распространению, взаимодействию с клеткой-хозяина и способам защиты картофеля от заражения. На основе современных методов молекулярной биологии проведен комплексный анализ современного уровня зараженности картофеля вирусными инфекциями в Казахстане. Установлено, что наиболее распространенными являются вирусы PVM и PVS (84,03 и 36,97%, соответственно, для Алматинской и 80,84 и 46,11%, соответственно для Костанайской областей Республики Казахстан), относящиеся к роду карлавирусов. Значительная часть полевых коллекций картофеля заражена комплексными вирусными инфекциями, самыми распространенными из которых являются PVM + PVS (26,89 и 43,11% в Алматинской и Костанайской областях, соответственно). При этом существует значительное разнообразие как штаммов, так и изолятов вирусов, что затруднило их диагностику. Осуществленная расшифровка геномов присутствующих казахстанских изолятов PVS, позволила разработать методику мультиплексной ПЦР, позволяющей устанавливать штаммовую принадлежность вируса.

Целью настоящего исследования являлась идентификация белков вируса PVS, проявляющих супрессионные свойства на механизм РНК интерференции, для получения растений, устойчивых к PVS. Для этого кодирующие последовательности открытых рамок считывания двух казахстанских изолятов PVS, относящихся к разным штаммам, были клонированы в агробактериальный вектор pBIN19, под контроль 35S CaMV промотора и *nos*-терминатора транскрипции. В результате была получена библиотека клонов двух казахстанских вариантов PVS «Fortune» и «Ushkonyr». Была осуществлена полногеномная расшифровка генетических последовательностей этих изолятов, аннотированная в базу данных NCBI GenBank под номерами MK442089 и MN095414, соответственно. Полученная библиотека клонов была использована для агротрансформации и последующей транзientной экспрессии в трансгенном табаке *Nicotiana benthamiana* линии 16с. Проведенная серия экспериментов не позволила достоверно установить наличие супрессорных функций белков PVS.

Кодирующие последовательности белка оболочки (CP) и «movement» протеина 25K PVS были клонированы в бинарный агробактериальный вектор pCAMBIA2300, под контроль 35S CaMV промотора и *nos*-терминатора транскрипции в двух инвертированных повторах, разделенные растительным интроном I гена каталазы *cat1* в прямой и обратной ориентациях. Полученные в результате клонирования четыре варианта рекомбинантных ДНК были использованы для агротрансформации 4-х свободных от вирусных инфекций и 12-ти зараженных вирусными инфекциями сортов казахстанской и зарубежной селекции. Установлено, что эффективность трансформации картофеля зависела не только от сортовых особенностей, но и от свойств трансгена, так использование в качестве трансгена кодирующей последовательности 25K было вдвое эффективнее, по сравнению с CP. Полученные на основе безвирусного картофеля 25 линий трансформантов были проверены на устойчивость к

заражению вирусом PVS в условиях теплицы, в результате чего были отобраны перспективные линии, показавшие задержку заражения вирусом PVS по сравнению с контрольными вариантами.

На основе зараженных одиночными и комплексными вирусными инфекциями сортов картофеля было получено 50 линий трансформантов. Часть линий показала освобождение от комплексной вирусной инфекции уже через 6 месяцев культивирования в теплице. Последующие 3-х летние полевые испытания продемонстрировали устойчивость 20-ти трансгенных линий к заражению не только PVS, но и PVM. Проведенный молекулярный анализ РНК трансгенных линий картофеля показал присутствие трансген-опосредованных киРНК у трех линий картофеля (№119, №61 и №103). Последующее секвенирование миРНК доказало, что устойчивость этих линий к заражению обусловлена экспрессией трансгенной вставки 25K PVS, разделенной интроном.

На основании полученных результатов можно сделать следующие **выводы**:

1. Наиболее распространенными вирусными инфекциями, поражающими картофель на территории Казахстана являются два представителя рода карлавирусов – PVS и PVM.
2. Белок-супрессор РНК интерференции вируса PVS методом транзientной экспрессии в растениях *N. benthamiana* линии 16с не диагностируется, возможно нужно использовать другой подход к установлению супрессора вируса PVS.
3. Использование интрон-шпилечных рекомбинантных ДНК для трансформации растений ведет не только к получению генетически устойчивых к вирусным инфекциям линий, но и способно оздоравливать зараженные растения посредством запуска механизма РНК интерференции.

Полученные в ходе выполнения работы результаты могут быть использованы для разработки биотехнологии получения новых сортов и гибридов картофеля с генетически закрепленной устойчивостью к определенным вирусным инфекциям, а также как один из инструментов оздоровления картофеля. Использование полученных таким способом растений, в качестве посадочного материала, позволит сократить использование дорогих инсектицидных препаратов для защиты картофеля от поражения тлей – основным переносчиком вирусных инфекций, что приведет к повышению урожайности и продуктивности картофеля.

В настоящее время внедрение новых подходов к повышению продуктивности агрокультур посредством развития устойчивости к различным инфекциям является перспективным направлением. Причин тому существует несколько – изменение климата, интенсификация сельского хозяйства, усиление продовольственной безопасности за счет выращивания собственных районированных сортов агрокультур, постоянное развитие резистентности у насекомых к применяемым средствам химической защиты растений и т.д. Предложенный в работе метод получения вирусоустойчивых растений может найти широкое применение в сельском хозяйстве, поскольку, в результате

генетической трансформации отсутствует продукт экспрессии трансгена в виде протеина, что позволяет предположить отсутствие негативных последствий использования таких генетически-модифицированных организмов в качестве продукта питания человека и корма для сельскохозяйственных животных.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Campos H., Ortiz O. The Potato Crop. – Springer International Publishing, 2019. – 518 p.
- 2 Итоги развития сферы сельского хозяйства за 2021 год и планы на предстоящий период. Официальный информационный ресурс Премьер-Министра Республики Казахстан // <https://primeminister.kz/ru/news/reviews/itogi-razvitiya-sfery-selskogo-hozyaystva-za-2021-god-i-plany-na-predstoyashchiy-period-22422> (дата обращения 17.02.2022).
- 3 Kumar R., Kumar Tiwari R., A J., Kaundal P., Sharma S., Chakrabarti SK. Potato viruses and their diagnostic techniques: An overview // Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. – 2019. – Vol. 8, №6. – P. 1932-1944.
- 4 Картофельводство Республики Казахстан: статистика по регионам. Экспертно-аналитический центр агробизнеса "АБ-Центр" // <https://ab-centre.ru/news/kartofelevodstvo-respubliki-kazahstan-statistika-po-regionam> (дата обращения 18.08.2022).
- 5 Новые перспективы семеноводства картофеля в Казахстане // <https://agro-mart.kz/novyie-perspektivy-semenovodstva-kartofelya-v-kazahstane/>. (дата обращения 04.01.2022).
- 6 Loebenstein G., Berger Ph.H., Brunt A.A., Lawson R.H. Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes. – Springer Science + Business Media Dordrecht, 2001. – 460 p.
- 7 Nikolaeva V.N., Dolanbayeva G.T., Khosnutdinova T.S., Bogdanova X.O., Zharkova S.V. Monitoring of viral and fungal diseases of potatoes in East Kazakhstan // IOP Conference Series: Earth Environmental Science. – 2022. – 1010. – 012141.
- 8 Khassanov V.T., Beisembina B., Shevtsov A.B., Amirgazin A.O., Vologin S.G., Karasev A.V. Occurrence of three recombinant strains of Potato Virus Y in potato in Kazakhstan // Plant Disease. – 2020. – Vol.104, №1. – P. 297.
- 9 Loebenstein G., Manadilova A. Virus and virus-like diseases of major crops in developing countries. – The Netherlands: Springer, Dordrecht, 2003. – 195 p.
- 10 Khassanov V.T., Vologin S.G. Occurrence of the ordinary and the andean strains of Potato Virus S infecting potatoes in the Eastern region of Kazakhstan // Plant Disease. – 2018. – Vol. 102, №10. – P. 2052
- 11 Kreuze J.F., Souza-Dias J.A.C., Jeevalatha A., Figueira A.R., Valkonen J.P.T., Jones R.A.C. Viral diseases in potato. In H. Campos & O. Ortiz (eds). The potato crop: its agricultural, nutritional and social contribution to humankind. Springer, Chap. 11. – P. 389-430.
- 12 Lin Y.H., Johnson D.A., Pappu H.R. Effect of Potato virus S infection on late blight resistance in potato // American Journal of Potato Resistance. – 2014. – Vol. 91, №6. – P. 642-648.
- 13 Hooker W.J. Compendium of potato diseases. – APS Press. The American Phytopathological Society, USA, 1990. – 149 p.
- 14 МЭТЬЮЗ Р. Вирусы растений. – М.: «Мир», 1973. – 600 с.

- 15 How important is Potato virus S (PVS)? Potatoes of New Zealand // <https://potatoesnz.co.nz/updates/biosecurity-updates/important-potato-virus-s-pvs>. (дата обращения 26.09.2022).
- 16 Weidemann H. L. Die Ausbreitung der Kartoffel Viren S und M unter feldbedingungen // Potato Research. – 1986. – Vol. 29. – P. 109-118.
- 17 Franc G. D., Bantari E. E. The transmission of potato virus S by the cutting knife and retention time of infectious PVS on common surfaces // American Potato Journal. – 1984. – Vol. 61. – P. 253-260.
- 18 Edwardson J.R., Christie R.G. Viruses infecting peppers and other solanaceous crops. – Monograph of Agricultural Experiment Station of Florida, 1997. – 427 p.
- 19 Monis J., Daniels S., De Zoeten G., Slack S. Characterization of potato virus S (PVS) genomic RNA // Phytopathology. – 1987. – Vol. 77 – P. 1742.
- 20 Mackenzie D., Tremaine J., Stace-Smith R. Organization and interviral homologies of 3'-terminal portion of potato virus RNA // Journal of General Virology. – 1989. – Vol. 70. – P. 1053-1063.
- 21 De Soura J., Gamarra H., Muller G., Kreuze J. First report of Potato virus S naturally infecting Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) in Peru // Plant disease. – 2018. – Vol. 102, No. 2. – P. 460.
- 22 Carlavirus. ViralZone // <https://viralzone.expasy.org/268> (дата обращения 26.09.2022).
- 23 Morozov S., Dolja V., Atabekov J. Probable reassortment of genomic elements among elongated RNS-containing plant viruses // Journal of Molecular Evolution. – 1989. – Vol. 29. – P. 52-62.
- 24 Morozov S., Solovyev A. Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement // Journal of General Virology. – 2003. – Vol. 84. – P. 1351-1366.
- 25 Foster G., Mills P. The 3'-nucleotide sequence of an ordinary strain of potato virus S // Virus Genes. – 1992. – Vol. 6. – P. 212-220.
- 26 Matoušek J., Schubert J., Ptaček J., Kozlova P., Dedič P. Complete nucleotide sequence and molecular probing of potato virus S genome // Acta Virologica. – 2005. – Vol. 49. – P. 195-205.
- 27 Gong H., Igiraneza C., Dusengemungu L. Major in vitro techniques for potato virus elimination and post eradication detection methods. A review // American Journal of Potato Research. – 2019. – Vol. 96. – P. 379-389.
- 28 Khurana J. Potato viruses and their management // Diseases of Fruits and Vegetables. – 2004. – Vol. 2, №1. – P. 389-440.
- 29 Zhang J., Nie X., Boquel S., Al-Daoud F., Pelletier Y. Increased sensitivity of RT-PCR for potato virus Y detection using RNA isolated by a procedure with differential centrifugation // Journal of Virological Methods. – 2015. – Vol. 225. – P. 49-54.
- 30 Гордеева Е.И., Крюкова А.В., Курбатова З.И. Иммунитет растений. – Великие Луки, 2011. – 127 с.
- 31 Shafikova T.N., Omelichkina Yu.V. Evolution of views on plant immunity: from Flor's "gene-for-gene" theory to the "zig-zag model" developed by

Jones and Dangl // Applied Chemistry and Biotechnology. – 2020. – Vol. 10, №3. – P. 424-438.

32 D'yakov Y.T. Fifty years of “gene-for-gene” theory // Advances in Current Biology. – 1996. – Vol. 116. – P. 293-305.

33 Orbegozo J., Solorzano D., Cuellar W., Bartolini I., Roman L., Ghislain M., Kreuze J. Marker-free PLRV resistant potato mediated by Cre-loxP excision and RNAi // Transgenic Research. – 2016. – Vol. 25, №6. – P. 813-828.

34 Bamberg J., Martin M., Abad J., Jenderek M., Tanner J., Donnelly D., Nassar A., Veilleux R., Novy R. *In vitro* technology at the US potato Genebank // *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. – 2016. – Vol. 52. – P. 213-225.

35 Danci M., Oana D., Luiza M., Anca B., Daniela O., Cerasela P., Berbentea F., David I. Production of virus free potato plantlets // Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology. – 2012. – Vol. 16, №1. – P. 232-238.

36 Wang Q., Liu Y., Xie Y., You M. Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of potato leafroll virus (PLRV) and potato virus Y (PVY) // Potato Research. – 2006. – Vol. 49, №2. – P. 119-129.

37 Wang Q., Valkonen J. Efficient elimination of Sweetpotato little leaf phytoplasma from sweet potato by cryotherapy of shoot tips // Plant Pathology. – 2008. – Vol. 57. – P. 338-347.

38 Sastry K., Zitter T. Management of Virus and Viroid Diseases of crops in the tropics // Plant Virus and Viroid Diseases in the Tropics. – 2014. – P. 149-480.

39 Cordeiro L. Stock indexing and potato virus Y elimination from potato plants cultivated in vitro stock indexing and potato virus Y elimination // Scientia Agricola. – 2003. – Vol. 60, №3. – P. 525-530.

40 Cassells A., Long R. The elimination of potato viruses X, Y, S and M in meristem and explant cultures of potato in the presence of virazole // Potato Research. – 1982. – Vol. 25, №2. – P. 165-173.

41 Ali M., Nasiruddin M., Haque M., Faisal S. Virus elimination in potato through meristem culture followed by thermotherapy // SAARC Journal of Agriculture. – 2014. – Vol. 11, №1. – P. 71-80.

42 Aguilar-Camacho M., Mora-Herrera M., López-Delgado H. Potato virus X (PVX) elimination as short and long term effects of hydrogen peroxide and salicylic acid is differentially mediated by oxidative stress in synergism with thermotherapy // American Journal of Potato Research. – 2016. – Vol. 93, №3. – P. 360-367.

43 Kushnarenko S., Romadanova N., Aralbayeva M., Zholamanova S., Alexandrova A., Karpova O. Combined ribavirin treatment and cryotherapy for efficient Potato virus M and Potato virus S eradication in potato (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro* shoots // *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. – 2017. – Vol. 53. – P. 425-432.

44 Panattoni A., Luvisi A., Triolo E. Elimination of viruses in plants: Twenty years of progress. Review // Spanish Journal of Agricultural Research. – 2013. – Vol. 11, №1. – P. 173-188.

45 Spiegel S., Frison E., Converse R. Recent development in therapy and virus-detection procedures for international movements of clonal plant germ plasm // Plant Disease. – 1993. – Vol. 77, №12. – P. 1176-1180.

- 46 Ruiz M., Voinnet O., Baulcombe D. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing by potato virus X // *The Plant Cell*. – 1998. – Vol. 10. – P. 937-946.
- 47 Carrington J., Kasschau D., Johansen K. Minireview activation and suppression of RNA silencing by plant viruses // *Virology*. – 2001. – Vol. 5. – P. 1-5.
- 48 Voinnet O. RNA silencing as a plant immune // *Trends in Genetics*. – 2001. – Vol. 17, №8. – P. 449-459.
- 49 Waswa M., Kakuhenzire R., Ochwo-Ssemakula M. Effect of thermotherapy duration, virus type and cultivar interactions on elimination of potato viruses X and S in infected seed stocks // *African Journal of Plant Science*. – 2017. – Vol. 11, №3. – P. 61-70.
- 50 Antonova O. Eradication of viruses in microplants of three cultivated potato species (*Solanum tuberosum* L., *S. phureja* Juz. & Buk., *S. stenotomum* Juz. & Buk.) using combined thermo-chemotherapy method // *Agrobiology*. – 2017. – Vol. 52, №1. – P. 95-104.
- 51 Lozoya-Saldaña F., Abelló J., García R. Electrotherapy and shoot tip culture eliminate potato virus X in potatoes // *American Journal of Potato Research*. – 1996. – Vol. 73, №4. – P. 149-154.
- 52 Emami M., Mozafari J., Babaeiyan N., Rahimian H. Application of electrotherapy for the elimination of potato potyviruses // *Journal of Agricultural Science and Technology*. – 2011. – Vol. 13. – P. 921-927.
- 53 Singh B., Kaur A. *In vitro* production of PLRV and PSTVd free plants of potato using electrotherapy // *Journal of Crop Science and Biotechnology*. – 2016. – Vol. 19, №4. – P. 285-294.
- 54 Whitham S., Dinesh-Kumar S.P., Choi D., Hehl R., Corr C., Baker B. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor // *Cell*. – 1994. – Vol. 78. – P. 1101-1115.
- 55 Whitham S., McCormick S., Baker B. The N gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato // *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. – 1996. – Vol. 6. – P. 8776-8781.
- 56 Moffett P., Farnham G., Peart J., Baulcombe D.C. Interaction between domains of a plant NBS-LRR protein in disease resistance-related cell death // *EMBO Journal*. – 2002. – Vol. 21. – P. 4511-4519.
- 57 Lanfermeijer F.C., Dijkhuis J., Sturre M.J.G., de Haan P., Hille J. Cloning and characterization of the durable tomato mosaic virus resistance gene Tm-22 from *Lycopersicon esculentum* // *Plant Molecular Biology*. – 2003. – Vol. 52. – P. 1037-1049.
- 58 Chisholm S.T., Mahajan S.K., Whitham S.A., Yamamoto M.L., Carrington J.C. // Cloning of the Arabidopsis RTM1 gene, which controls restriction of long-distance movement of tobacco etch virus // *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. – 2000. – Vol. 97. – P. 489-494.
- 59 Whitham S.A., Anderberg R.J., Chisholm S.T., Carrington, J.C. Arabidopsis RTM2 gene is necessary for specific restriction of tobacco etch virus and encodes an unusual small heat shock-like protein // *Plant Cell*. – 2000. – Vol. 12. – P. 569-582.

- 60 Gutierrez-Campos R., Torres-Acosta J.A., Saucedo-Arias L.J., Gomez-Lim M.A. The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants // *Nature Biotechnology*. – 1999. – Vol. 17. – P. 1223-1226.
- 61 Csorba T., Burgyán J. Antiviral Silencing and Suppression of Gene Silencing in Plants. *Current Research Topics in Plant Virology*. - Springer, 2016. – p. 1-33.
- 62 Agrawal N., Dasaradhi P.V., Mohammed A., Malhotra P., Bhatnagar R.K., Mukherjee S.K. RNA interference: biology, mechanism, and applications // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2003. – Vol. 67, №4. – P. 657-685.
- 63 Bender J. A vicious cycle: RNA silencing and DNA methylation in plants // *Cell*. – 2001. – Vol. 106. – P. 129-132.
- 64 Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M., Hannon G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference // *Nature*. – 2001. – Vol. 409. – P. 363-366.
- 65 Fagard M., Vaucheret H. (Trans) gene silencing in plants: how many mechanisms? // *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*. – 2000. – Vol. 51. – P. 167-194.
- 66 Wassenegger M., Pelissier T. A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants // *Plant Molecular Biology*. – 1998. – Vol. 37, №2. – P. 349-362.
- 67 Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. Introduction of chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible cosuppression of homologous genes in trans // *Plant Cell*. – 1990. – Vol. 2, №4. – P. 279-289.
- 68 Van Blokland R., vander Geest N., Mol J.N.M., Kooter J.M. Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover // *Plant Journal*. – 1994. – Vol. 6, №6. – P. 861-877.
- 69 Ingelbrecht I., Van Houdt H., Van Montagu M., Depicker A. Post-transcriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 1994. – Vol. 91, №22. – P. 10502-10506.
- 70 Vander Krol A.R., Mur L.A., Beld M., Mol J.N.M., Stuitje A.R. Flavanoid genes in petunia: addition of limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression // *Plant Cell*. – 1990. – Vol. 2, №4. – P. 291-299.
- 71 Kooter J.M., Matzke M.A., Meyer P. Listening to silent gene: transgene silencing, gene regulation and pathogen control // *Trends in Plant Science*. – 1999. – Vol. 4, №9. – P. 340-347.
- 72 Francesco D.S., Hanspeter S., Alejandro L., Cornia T., Estelle B., Frederick M. Sense- and anti-sense mediated gene silencing in tobacco is inhibited by the same viral suppressors and is associated with accumulation of small RNAs // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2001. – Vol. 96, №11. – P. 6506-6510.
- 73 Hannon G.J. RNA Interference // *Nature*. – 2002. – Vol. 418, №6894. – P. 244-251.

- 74 Metzloff M., O'Dell M., Cluster P.D., Flavell R.B. RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in *Petunia* // *Cell*. – 1997. – Vol. 88, №6. – P. 845-854.
- 75 Chuang C.F., Meyerowitz E.M. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana* // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2000. – Vol. 97, №9. – P. 4985-4990.
- 76 Smith N.A., Singh S.P., Wang M.B., Stoutjesdijk P.A., Green A.G., Waterhouse P.M. Total silencing by intron spliced hairpin RNA // *Nature*. – 2000. – Vol. 407, №6802. – P. 319-320.
- 77 English J.J., Mueller E., Baulcombe D.C. Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes // *Plant Cell*. – 1996. – Vol. 8, №2. – P. 179-188.
- 78 Lindbo J.A., Dougherty W.G. Untranslatable transcripts of tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts // *Virology*. – 1992. – Vol. 189, №2. – P. 725-733.
- 79 Al-Kaff N.S., Covey S.N., Kreike M.M., Page A.M., Pinder R., Dale P. Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen // *Science*. – 1998. – Vol. 279, №5359. – P. 2113-2115.
- 80 Hamilton A.J., Baulcombe D.C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants // *Science*. – 1999. – Vol. 286, №5441. – P. 950-952.
- 81 Hamilton A.J., Brown S., Yuanhai H., Ishizuka M., Lowe A. A transgene with repeated DNA causes high frequency, post-transcriptional suppression of ACC-oxidase gene expression in tomato // *Plant Journal*. – 1998. – Vol. 15, №6. – P. 737-746.
- 82 Zamore P.D., Tuschl T., Sharp P.A., Bartel D.P. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21- to 23-nucleotide intervals // *Cell*. – 2000. – Vol. 101, №1. – P. 25-33.
- 83 Yang D., Lu H., Erichson J.W. Evidence that processed small dsRNA may mediate sequence specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos // *Current Biology*. – 2000. – Vol. 10, №19. – P. 1191-1200.
- 84 Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *C. elegans* // *Nature*. – 1998. – Vol. 391, №6669. – P. 806-811.
- 85 Lohmann J.U., Endl I., Bosch T.C.G. Silencing of developmental genes in *Hydra* // *Developmental Biology*. – 1999. – Vol. 214, №1. – P. 211-214.
- 86 Palauqui J.C., Elmayan T., Pollien J.M., Vaucheret H. Systemic acquired silencing: transgene specific posttranscriptional gene silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to nonsilenced scions // *EMBO Journal*. – 1997. – Vol. 16, № 15. – P. 4738-4745.
- 87 Fagard M., Boutet S., Morel J.-B., Bellini C., Vaucheret H. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2000. – Vol. 97, №21. – P. 11650-11654.

- 88 Waterhouse P.M., Graham M.W., Wang M.B. Virus resistance in gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 1998. – Vol. 95, №23. – P. 13959-13964.
- 89 Svoboda P. Key mechanistic principles and considerations concerning RNA interference // *Frontiers Plant Science*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1237.
- 90 Ketting R.F. The many faces of RNAi // *Developmental Cell*. – 2011. – Vol. 20, №2. – P. 148-161.
- 91 Kim V.N., Han J., Siomi M.C. Biogenesis of small RNAs in animals // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2009. – Vol. 10, №2. – P. 126-139.
- 92 Borges F., Martienssen R.A. The expanding world of small RNAs in plants // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2015. – Vol. 16, №12. – P. 727-741.
- 93 Maida Y., Masutomi K. RNA-dependent RNA polymerases in RNA silencing // *Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 392, №4. – P. 299-304.
- 94 Sijen T., Fleenor J., Simmer F., Thijssen K.L., Parrish S., Timmons L., Plasterk R.H., Fire A. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing // *Cell*. – 2001. – Vol. 107, №4. – P. 465-476.
- 95 Ding S.W., Voinnet O. Antiviral immunity directed by small RNAs // *Cell*. – 2007. – Vol. 130, №3. – P. 413-426.
- 96 Bologna N.G., Voinnet O. The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis // *Annual Review of Plant Science*. – 2014. – Vol. 65. – P. 473-503.
- 97 Muhammad T., Zhang F., Zhang Y., Liang Y. RNA interference: a natural immune system of plants to counteract biotic stressors // *Cells*. – 2019. – Vol. 8, №1. – P. 38.
- 98 Carmell M.A., Hannon G.J. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2004. – Vol. 11, №3. – P. 214-218.
- 99 Cordin O., Banroques J., Tanner N.K., Linder P. The DEAD-box protein family of RNA helicases // *Gene*. – 2006. – Vol. 367. – P. 17-37.
- 100 Montavon T., Kwon Y., Zimmermann A., Hammann P., Vincent T., Cognat V., Bergdoll M., Michel F.; Dunoyer P. Characterization of DCL4 missense alleles provides insights into its ability to process distinct classes of dsRNA substrates // *Plant Journal*. – 2018. – Vol. 95, №2. – P. 204-218.
- 101 Park J.E.; Heo I.; Tian Y.; Simanshu D.K.; Chang H.; Jee D.; Patel D.J.; Kim V.N. Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing // *Nature*. – 2011. – Vol. 475, №7355. – P. 201-205.
- 102 Tian Y., Simanshu D.K., Ma J.B., Park J.E., Heo I.; Kim V.N.; Patel D.J. A phosphate-binding pocket within the platform-PAZ-connector helix cassette of human Dicer // *Molecular Cell*. – 2014. – Vol. 53, №4. – P. 606-616.
- 103 Kandasamy S.K., Fukunaga R. Phosphate-binding pocket in Dicer-2 PAZ domain for high-fidelity siRNA production // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2016. – Vol. 113, №49. – P. 14031-14036.

- 104 Kurzynska-Kokorniak A.; Pokornowska M.; Koralewska N.; Hoffmann W.; Bienkowska-Szewczyk K.; Figlerowicz M. Revealing a new activity of the human Dicer DUF283 domain *in vitro* // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 23989.
- 105 Aguado L.C., tenOever B.R. RNase III nucleases and the evolution of antiviral systems // *BioEssays*. – 2018. – Vol. 40. – P. 1700173.
- 106 Nicholson A.W. Ribonuclease III mechanisms of double-stranded RNA cleavage // *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. – 2014. – Vol. 5, №1. – P. 31-48.
- 107 Barraud P., Banerjee S., Mohamed W.I., Jantsch M.F., Allain F.H.-T. A bimodular nuclear localization signal assembled via an extended double-stranded RNA-binding domain acts as an RNA-sensing signal for transportin 1 // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2014. – Vol. 111. – P. E1852-E1861.
- 108 Banerjee S., Barraud P. Functions of double-stranded RNA-binding domains in nucleocytoplasmic transport // *RNA Biology*. – 2014. – Vol. 11. – P. 1226-1232.
- 109 Hohn T., Vazquez F. RNA silencing pathways of plants: Silencing and its suppression by plant DNA viruses // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2011. – Vol. 1809. – P. 588-600.
- 110 Coursey T., Regedanz E., Bisaro D.M. Arabidopsis RNA polymerase V mediates enhanced compaction and silencing of geminivirus and transposon chromatin during host recovery from infection // *Journal of Virology*. – 2018. – Vol. 92, №7. – P. e01320-17.
- 111 Vazquez F., Vaucheret H., Rajagopalan R., Lepers C., Gascioli V., Mallory A.C., Hilbert J.L., Bartel D.P., Cr  t   P. Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs // *Molecular Cell*. – 2004. – Vol. 16. – P. 69-79.
- 112 Dunoyer P., Himber C., Voinnet O. Dicer-like 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal // *Nature Genetics*. – 2005. – Vol. 37. – P. 1356-1360.
- 113 Gascioli V., Mallory A.C., Bartel D.P., Vaucheret H. Partially redundant functions of Arabidopsis Dicer-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs // *Current Biology*. – 2005. – Vol. 15. – P. 1494-1500.
- 114 Mallory A., Vaucheret H. Form, function, and regulation of Argonaute proteins // *Plant Cell*. – 2010. – Vol. 22. – P. 3879–3889.
- 115 Parker J.S. How to slice: Snapshots of Argonaute in action // *Silence*. – 2010. – Vol. 1: 3.
- 116 Simon B., Kirkpatrick J.P., Eckhardt S., Reuter M., Rocha E.A., Andrade-Navarro M.A., Sehr P., Pillai R.S., Carlomagno T. Recognition of 2'-o-methylated 3'-end of piRNA by the PAZ domain of a Piwi protein // *Structure*. – 2011. – Vol. 19. – P. 172-180.
- 117 R  hl A., Rohrberg J., Buchner J. The chaperone Hsp90: Changing partners for demanding clients. *Trends in Biochemical Sciences*. – 2013. – Vol. 38. – P. 253-262.
- 118 Ye R., Wang W., Iki T., Liu C., Wu Y., Ishikawa M., Zhou X., Qi Y. Cytoplasmic assembly and selective nuclear import of Arabidopsis Argonaute4/siRNA complexes // *Molecular Cell*. – 2012. – Vol. 46. – P. 859-870.

- 119 Khvorova A., Reynolds A., Jayasena S.D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias // *Cell*. – 2003. – Vol. 115. – P. 209-216.
- 120 Schwarz D.S., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N., Zamore P.D. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex // *Cell*. – 2003. – Vol. 115. – P. 199-208.
- 121 Dalmay T., Hamilton A., Rudd S., Angell S., Baulcombe D.C. An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus // *Cell*. – 2000. – Vol. 101. – P. 543-553.
- 122 Mourrain P., Béclin C., Elmayan T., Feuerbach F., Godon C., Morel J.B., Jouette D., Lacombe A.M., Nikić S., Picault N., Rémoué K., Sanial M., Vo T.A., Vaucheret H. Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance // *Cell*. – 2000. – Vol. 101. – P. 533-542.
- 123 Wang M.B., Metzloff M. RNA silencing and antiviral defense in plants // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2005. – Vol. 8. – P. 216-222.
- 124 Zong J., Yao X., Yin J., Zhang D., Ma H. Evolution of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) genes: Duplications and possible losses before and after the divergence of major eukaryotic groups // *Gene*. – 2009. – Vol. 447, 29-39.
- 125 Venkataraman S., Prasad B., Selvarajan R. RNA dependent RNA polymerases: Insights from structure, function and evolution // *Viruses*. – 2018. – Vol. 10: 76.
- 126 Pandey S.P., Baldwin I.T. RNA-directed RNA polymerase 1 (RdR1) mediates the resistance of *Nicotiana attenuata* to herbivore attack in nature // *Plant Journal*. – 2007. – Vol. 50. – P. 40-53.
- 127 Liu Y., Gao Q., Wu B., Ai T., Guo X. NgRDR1, an RNA-dependent RNA polymerase isolated from *Nicotiana glutinosa*, was involved in biotic and abiotic stresses // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2009. – Vol. 47. – P. 359-368.
- 128 Hunter L.J.R., Westwood J.H., Heath G., Macaulay K., Smith A.G., MacFarlane S.A., Palukaitis P., Carr J.P. Regulation of RNA-dependent RNA polymerase 1 and isochorismate synthase gene expression in Arabidopsis // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8. – P. e66530.
- 129 Deng S., Xu J., Liu J., Kim S.H., Shi S., Chua N.H. JMJ24 binds to RDR2 and is required for the basal level transcription of silenced loci in Arabidopsis // *Plant Journal*. – 2015. – Vol. 83. – P. 770-782.
- 130 Jia Y., Lisch D.R., Ohtsu K., Scanlon M.J., Nettleton D., Schnable P.S. Loss of RNA-dependent RNA polymerase 2 (RDR2) function causes widespread and unexpected changes in the expression of transposons, genes, and 24-nt small RNAs // *PLOS Genetics*. – 2009. – Vol. 5. – P. e1000737.
- 131 Jauvion V., Rivard M., Bouteiller N., Elmayan T., Vaucheret H. RDR2 partially antagonizes the production of RDR6-dependent siRNA in sense transgene-mediated PTGS // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7. – P. e29785.
- 132 Nuthikattu S., McCue A.D., Panda K., Fultz D., DeFraia C., Thomas E.N., Slotkin R.K. The initiation of epigenetic silencing of active transposable elements is triggered by RDR6 and 21–22 nucleotide small interfering RNAs // *Plant Physiology*. – 2013. – Vol. 162. – P. 116-131.

- 133 Brosnan C.A., Mitter N., Christie M., Smith N.A., Waterhouse P.M., Carroll B.J. Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in *Arabidopsis* // Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. – 2007. – Vol. 104. – P. 14741-14746.
- 134 Liu Q., Yao X., Pi L., Wang H., Cui X., Huang H. The Argonaute 10 gene modulates shoot apical meristem maintenance and establishment of leaf polarity by repressing miR165/166 in *Arabidopsis* // Plant Journal. – 2009. – Vol. 58. – P. 27-40.
- 135 Dalakouras A., Lauter A., Bassler A., Krczal G., Wassenegger M. Transient expression of intron-containing transgenes generates non-spliced aberrant pre-mRNAs that are processed into siRNAs // Planta. – 2018. – Vol. 249, №2. – P. 457-468.
- 136 Vaucheret H. Plant Argonautes // Trends in Plant Science. – 2008. – Vol. 13. – P. 350-358.
- 137 Zhao X., Zheng W., Zhong Z., Chen X., Wang A., Wang Z. Genome-wide analysis of RNA-interference pathway in *Brassica napus*, and the expression profile of BnAGOs in response to *Sclerotinia sclerotiorum* infection // European Journal of Plant Pathology. – 2016. – Vol. 146. – P. 565-579.
- 138 Cao J.-Y., Xu Y.-P., Li W., Li S.-S., Rahman H., Cai X.-Z. Genome-wide identification of Dicer-like, Argonaute, and RNA-dependent RNA polymerase gene families in *Brassica* species and functional analyses of their *Arabidopsis* homologs in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* // Frontiers in Plant Science. – 2016. – Vol. 7. – P. 1614.
- 139 Qin L., Mo N., Muhammad T., Liang Y. Genome-wide analysis of DCL, AGO, and RDR gene families in pepper (*Capsicum Annuum* L.) // International Journal of Molecular Sciences. – 2018. – Vol. 19. – 1038.
- 140 Fernandes-Brum C.N., Rezende P.M., Ribeiro T.H.C., De Oliveira R.R., De Sousa Cardoso T.C., Do Amaral L.R., De Souza Gomes M., Chalfun A. A genome-wide analysis of the RNA-guided silencing pathway in coffee reveals insights into its regulatory mechanisms // PLoS ONE. – 2017. – Vol. 12. – e0176333.
- 141 Gan D., Zhan M., Yang F., Zhang Q., Hu K., Xu W., Lu Q., Zhang L., Liang D. Expression analysis of argonaute, Dicer-like, and RNA-dependent RNA polymerase genes in cucumber (*Cucumis sativus* L.) in response to abiotic stress // Journal of Genetics. – 2017. – Vol. 96. – P. 235-249.
- 142 Liu X., Lu T., Dou Y., Yu B., Zhang C. Identification of RNA silencing components in soybean and sorghum // BMC Bioinformatics. – 2014. – Vol. 15: 4.
- 143 Nakasugi K., Crowhurst R.N., Bally J., Wood C.C., Hellens R.P., Waterhouse P.M. *De novo* transcriptome sequence assembly and analysis of RNA silencing genes of *Nicotiana benthamiana* // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8. – e59534.
- 144 Kapoor M., Arora R., Lama T., Nijhawan A., Khurana J.P., Tyagi A.K., Kapoor S. Genome-wide identification, organization and phylogenetic analysis of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA Polymerase gene families and their expression analysis during reproductive development and stress in rice // BMC Genomics. – 2008. – Vol. 9. – 451.
- 145 De Sousa Cardoso T.C., Portilho L.G., de Oliveira C.L., Mckeown P.C., Maluf W.R., Gomes L.A.A., Teixeira T.A., do Amaral L.R., Spillane C., de Souza

Gomes M. Genome-wide identification and *in silico* characterisation of microRNAs, their targets and processing pathway genes in *Phaseolus vulgaris* L. // Plant Biology. – 2016. – Vol. 18. – P. 206-219.

146 Shao F., Lu S. Genome-wide identification, molecular cloning, expression profiling and posttranscriptional regulation analysis of the Argonaute gene family in *Salvia miltiorrhiza*, an emerging model medicinal plant // BMC Genomics. – 2013. – Vol. 14. – 512.

147 Shao F., Lu S. Identification, molecular cloning and expression analysis of five RNA-dependent RNA polymerase genes in *Salvia miltiorrhiza* // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9. – e95117.

148 Shao F., Qiu D., Lu S. Comparative analysis of the Dicer-like gene family reveals loss of miR162 target site in SmDCL1 from *Salvia miltiorrhiza* // Scientific Reports. – 2015. – Vol. 5. – P. 9891.

149 Yadav C.B., Muthamilarasan M., Pandey G., Prasad M. Identification, characterization and expression profiling of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families in foxtail millet // Plant Molecular Biology Reporter. – 2015. – Vol. 33. – P. 43-55.

150 Bai M., Yang G.S., Chen W.T., Mao Z.C., Kang H.X., Chen G.H., Yang Y.H., Xie B.Y. Genome-wide identification of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families and their expression analyses in response to viral infection and abiotic stresses in *Solanum lycopersicum* // Gene. – 2012. – Vol. 501. – P. 52-62.

151 Mirzaei K., Bahramnejad B., Shamsifard M.H., Zamani W. *In silico* identification, phylogenetic and bioinformatic analysis of argonaute genes in plants // International Journal of Genomics. – 2014. – Vol. 2014. – P. 967461.

152 Esposito S., Aversano R., D'Amelia V., Villano C., Alioto D., Mirouze M., Carputo D. Dicer-like and RNA-dependent RNA polymerase gene family identification and annotation in the cultivated *Solanum tuberosum* and its wild relative *S. commersonii* // Planta. – 2018. – Vol. 248. – P. 729-743.

153 Zhao H., Zhao K., Wang J., Chen X., Chen Z., Cai R., Xiang Y. Comprehensive analysis of Dicer-like, Argonaute, and RNA-dependent RNA polymerase gene families in grapevine (*Vitis vinifera*) // Journal of Plant Growth Regulation. – 2015. – Vol. 34. – P. 108-121.

154 Qian Y., Cheng Y., Cheng X., Jiang H., Zhu S., Cheng B. Identification and characterization of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families in maize // Plant Cell Reports. – 2011. – Vol. 30. – P. 1347-1363.

155 Wang X.-B., Jovel J., Udornporn P., Wang Y., Wu Q., Li W.-X., Gascioli V., Vaucheret H., Ding S.-W. The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative Argonautes in *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell. – 2011. – Vol. 23. – P. 1625-1638.

156 Bisaro D.M. Silencing suppression by geminivirus proteins // Virology. – 2006. – Vol. 344. – P. 158-168.

157 Akbergenov R., Si-Ammour A., Blevins T., Amin I., Kutter C., Vanderschuren H., Zhang P., Gruissem W., Meins F., Hohn T., Pooggin M.M.

Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species // *Nucleic Acids Research*. – 2006. – Vol. 34. – P. 462-471.

158 Jaubert M., Bhattacharjee S., Mello A.F.S., Perry K.L., Moffett P. Argonaute 2 mediates RNA-silencing antiviral defenses against potato virus X in *Arabidopsis* // *Plant Physiology*. – 2011. – Vol. 156. – P. 1556-1564.

159 Garcia-Ruiz H., Carbonell A., Hoyer J.S., Fahlgren N., Gilbert K.B., Takeda A., Giampetruzzi A., Garcia Ruiz M.T., McGinn M.G., Lowery N., Martinez Baladejo M.T., Carrington J.C. Roles and programming of *Arabidopsis* Argonaute proteins during turnip mosaic virus infection // *PLoS Pathogens*. – 2015. – Vol. 11. – e1004755.

160 Harvey J.J.W., Lewsey M.G., Patel K., Westwood J., Heimstädt S., Carr J.P., Baulcombe D.C. An antiviral defense role of AGO2 in plants // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6. – e14639.

161 Takeda A., Iwasaki S., Watanabe T., Utsumi M., Watanabe Y. The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among Argonaute proteins // *Plant Cell Physiology*. – 2008. – Vol. 49. – P.493-500.

162 Brosseau C., Moffett P. Functional and genetic analysis identify a role for *Arabidopsis* Argonaute 5 in antiviral RNA silencing // *Plant Cell*. – 2015. – Vol. 27. – P. 1742-1754.

163 Qu F., Ye X., Morris T.J. *Arabidopsis* DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1 // *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. – 2008. – Vol. 105. – P. 14732-14737.

164 Morel J., Godon C., Mourrain P., Béclin C., Boutet S., Feuerbach F., Proux F., Vaucheret H. Fertile hypomorphic Argonaute (*ago1*) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance // *Plant Cell*. – 2002. – Vol. 14. – P. 629-639.

165 Lewsey M.G., Murphy A.M., Maclean D., Dalchau N., Westwood J.H., Macaulay K., Bennett M.H., Moulin M., Hanke D.E., Powell G., Smith A.G., Carr J.P. Disruption of two defensive signaling pathways by a viral RNA silencing suppressor // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2010. – Vol. 23. – P. 835-845.

166 Ludman M., Burgyán J., Fátýol K. CRISPR/Cas9 mediated inactivation of Argonaute 2 reveals its differential involvement in antiviral responses // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7, №1. – 1010.

167 Paudel D.B., Ghoshal B., Jossey S., Ludman M., Fatyol K., Sanfaçon H. Expression and antiviral function of Argonaute 2 in *Nicotiana benthamiana* plants infected with two isolates of tomato ringspot virus with varying degrees of virulence // *Virology*. – 2018. – Vol. 524. – P. 127-139.

168 Jones L., Keining T., Eamens A., Vaistij F.E. Virus-induced gene silencing of Argonaute genes in *Nicotiana benthamiana* demonstrates that extensive systemic silencing requires Argonaute 1-like and Argonaute 4-like genes // *Plant Physiology*. – 2006. – Vol. 141. – P. 598-606.

169 Au P.C.K., Dennis E.S., Wang M.B. Analysis of argonaute 4-associated long non-coding RNA in *Arabidopsis thaliana* sheds novel insights into gene

regulation through RNA-directed DNA methylation // *Genes*. – 2017. – Vol. 8. – P. 198.

170 Ahlquist P. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing // *Science*. – 2002. – Vol. 296. – P. 1270-1273.

171 Donaire L., Wang Y., Gonzalez-Ibeas D., Mayer K.F., Aranda M.A., Llave C. Deep-sequencing of plant viral small RNAs reveals effective and widespread targeting of viral genomes // *Virology*. – 2009. – Vol. 392. – P. 203-214.

172 Szittyá G., Moxon S., Pantaleo V., Toth G., Rusholme Pilcher R.L., Moulton V., Burgyan J., Dalmay T. Structural and functional analysis of viral siRNAs // *PLoS Pathogens*. – 2010. – Vol. 6. – e1000838.

173 Aregger M., Borah B.K., Seguin J., Rajeswaran R., Gubaeva E.G., Zvereva A.S., Windels D., Vazquez F., Blevins T., Farinelli L., Pooggin M.M. Primary and secondary siRNAs in geminivirus induced gene silencing // *PLoS Pathogens*. – 2012. – Vol. 8. – e1002941.

174 Andika I.B., Maruyama K., Sun L., Kondo H., Tamada T., Suzuki N. Different Dicer-like protein components required for intracellular and systemic antiviral silencing in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Signaling & Behavior*. – 2015. – Vol. 10. – e1039214.

175 Parent J.S., Bouteiller N., Elmayan T., Vaucheret H. Respective contributions of *Arabidopsis* DCL2 and DCL4 to RNA silencing // *Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*. – 2015. – Vol. 81. – P. 223-232.

176 Raja P., Jackel J.N., Li S., Heard I.M., Bisaro D.M. *Arabidopsis* double-stranded RNA binding protein DRB3 participates in methylation-mediated defense against geminiviruses // *Journal of Virology*. – 2014. – Vol. 88. – P. 2611-2622.

177 Azevedo J., Garcia D., Pontier D., Ohnesorge S., Yu A., Garcia S., Braun L., Bergdoll M., Hakimi M.A., Lagrange T., Voinnet O. Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein // *Genes & Development*. – 2010. – Vol. 24. – P. 904-915

178 Hamera S., Song X., Su L., Chen X., Fang R. Cucumber mosaic virus suppressor 2b binds to AGO4-related small RNAs and impairs AGO4 activities // *Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*. – 2012. – Vol. 69. – P. 104-115.

179 Lacombe S., Bangratz M., Vignols F., Brugidou C. The rice yellow mottle virus P1 protein exhibits dual functions to suppress and activate gene silencing // *Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*. – 2010. – Vol. 61. – P. 371-382.

180 Jakubiec A., Yang S.W., Chua N.H. *Arabidopsis* DRB4 protein in antiviral defense against Turnip yellow mosaic virus infection // *Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*. – 2012. – Vol. 69. – P. 14-25.

181 Vogler H., Akbergenov R., Shivaprasad P.V., Dang V., Fasler M., Kwon M.O., Zhanybekova S., Hohn T., Heinlein M. Modification of small RNAs associated with suppression of RNA silencing by tobamovirus replicase protein // *Journal of Virology*. – 2007. – Vol. 81. – P. 10379-10388.

182 Boutet S., Vazquez F., Liu J., Beclin C., Fagard M., Gratias A., Morel J.B., Crete P., Chen X., Vaucheret H. *Arabidopsis* HEN1: a genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance // *Current Biology*. – 2003. – Vol. 13. – P. 843-848.

- 183 Zhang X., Zhang X., Singh J., Li D., Qu F. Temperature-dependent survival of Turnip crinkle virus-infected arabidopsis plants relies on an RNA silencing-based defense that requires dcl2, AGO2, and HEN1 // *Journal of Virology*. – 2012. – Vol. 86. – P. 6847-6854.
- 184 Csorba T., Kontra L., Burgyan J. Viral silencing suppressors: tools forged to fine-tune hostpathogen coexistence // *Virology*. – 2015. – Vol. 479-480. – P. 85-103.
- 185 Schuck J., Gursinsky T., Pantaleo V., Burgyan J., Behrens S.E. AGO/RISC-mediated antiviral RNA silencing in a plant *in vitro* system // *Nucleic Acids Research*. – 2013. – Vol. 41. – P. 5090-5103.
- 186 Zhang X., Niu D., Carbonell A., Wang A., Lee A., Tun V., Wang Z., Carrington J.C., Chang C.E., Jin H. ARGONAUTE PIWI domain and microRNA duplex structure regulate small RNA sorting in Arabidopsis // *Nature Communications*. – 2014. – Vol. 5. – P. 5468.
- 187 Omarov R.T., Ciomperlik J., Scholthof H.B. An *in vitro* reprogrammable antiviral RISC with size-preferential ribonuclease activity // *Virology*. – 2016. – Vol. 490. – P. 41-48.
- 188 Iki T., Yoshikawa M., Nishikiori M., Jaudal M.C., Matsumoto-Yokoyama E., Mitsuhashi I., Meshi T., Ishikawa M. *In vitro* assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90 // *Molecular Cell*. – 2010. – Vol. 39. – P. 282-291.
- 189 Fatyol K., Ludman M., Burgyan J. Functional dissection of a plant Argonaute // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – Vol. 44, №3. – P. 1384-1397.
- 190 Wassenegger M., Krczal G. Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases // *Trends in Plant Science*. – 2006. – Vol. 11. – P. 142-151.
- 191 Gazzani S., Lawrenson T., Woodward C., Headon D., Sablowski R. A link between mRNA turnover and RNA interference in Arabidopsis // *Science*. – 2004. – Vol. 306. – P. 1046-1048.
- 192 Blevins T., Rajeswaran R., Shivaprasad P.V., Beknazariants D., Si-Ammour A., Park H.S., Vazquez F., Robertson D., Meins F. Jr., Hohn T., Pooggin M.M. Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing // *Nucleic Acids Research*. – 2006. – Vol. 34. – P. 6233-6246.
- 193 Bouche N., Laressergues D., Gascioli V., Vaucheret H. An antagonistic function for Arabidopsis DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs // *EMBO Journal*. – 2006. – Vol. 25. – P. 3347-3356.
- 194 Bronkhorst A.W., van Rij R.P. The long and short of antiviral defense: small RNA-based immunity in insects // *Current Opinion in Virology*. – 2014. – Vol. 7. – P. 19-28.
- 195 Burgyán J., Havelda Z. Viral suppressors of RNA silencing // *Trends in Plant Science*. – 2011. – Vol. 16. – P. 265-272.
- 196 Diaz-Pendon J.A., Li F., Li W.-X., Ding S.-W. Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in Arabidopsis is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs // *Plant Cell*. – 2007. – Vol. 19. – P. 2053-2063.

- 197 Haas G., Azevedo J., Moissiard G., Geldreich A., Himber C., Bureau M., Fukuhara T., Keller M., Voinnet O. Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4 // *EMBO Journal*. – 2008. – Vol. 27. – P. 2102-2112.
- 198 Deleris A., Gallago-Bartolome J., Bao J., Kasschau K.D., Carrington J.C., Voinnet O. Hierarchical action and inhibition of plant dicer-like proteins in antiviral defense // *Science*. – 2006. – Vol. 313. – P. 68-71.
- 199 Fernández-Calvino L., Martínez-Priego L., Szabo E.Z., Guzmán-Benito I., González I., Canto T., Lakatos L., Llave C. Tobacco rattle virus 16K silencing suppressor binds Argonaute 4 and inhibits formation of RNA silencing complexes // *Journal of General Virology*. – 2016. – Vol. 97. – P. 246-257.
- 200 Zhang X., Yuan Y., Pei Y., Lin S., Tuschl T., Patel D.J., Chua N. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense // *Genes & Development*. – 2006. – Vol. 20. – P. 3255-3268.
- 201 Pazhouhandeh M., Dieterle M., Marrocco K., Lechner E., Berry B., Brault V., Hemmer O., Kretsch T., Richards K.E., Genschik P., Ziegler-Graff V. F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function // *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. – 2006. – Vol. 103. – P. 1994-1999.
- 202 Baumberger N., Tsai C.H., Lie M., Havecker E., Baulcombe D.C. The polerovirus silencing suppressor P0 targets Argonaute proteins for degradation // *Current Biology*. – 2007. – Vol. 17. – P. 1609-1614.
- 203 Bortolamiol D., Pazhouhandeh M., Marrocco K., Genschik P., Ziegler-Graff V. The polerovirus F box protein P0 targets Argonaute1 to suppress RNA silencing // *Current Biology*. – 2007. – Vol. 17. – P. 1615-1621.
- 204 Kenesi E., Carbonell A., Lózsa R., Vértessy B., Lakatos L. A viral suppressor of RNA silencing inhibits Argonaute 1 function by precluding target RNA binding to pre-assembled RISC // *Nucleic Acids Research*. – 2017. – Vol. 45. – P. 7736-7750.
- 205 Silhavy D., Burgyán J. Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs // *Trends in Plant Science*. – 2004. – Vol. 9. – P. 76-83.
- 206 Martínez-Turiño S., Hernández C. Inhibition of RNA silencing by the coat protein of Pelargonium flower break virus: Distinctions from closely related suppressors // *Journal of General Virology*. – 2009. – Vol. 90. – P. 519-525.
- 207 Garcia-Ruiz H., Gabriel Peralta S.M., Harte-Maxwell P.A. Tomato spotted wilt virus NSs protein supports infection and systemic movement of a potyvirus and is a symptom determinant // *Viruses*. – 2018. – Vol. 10. – P. 129.
- 208 Kontra L., Csorba T., Tavazza M., Lucioli A., Tavazza R., Moxon S., Tisza V., Medzihradzky A., Turina M., Burgyán J. Distinct effects of p19 RNA silencing suppressor on small RNA mediated pathways in plants // *PLoS Pathogens*. – 2016. – Vol. 12. – e1005935.
- 209 Scholthof H.B., Alvarado V.Y., Vega-Arreguin J.C., Ciomperlik J., Odokonyero D., Brosseau C., Jaubert M., Zamora A., Moffett P. Identification of an

Argonaute for antiviral RNA silencing in *Nicotiana benthamiana* // *Plant Physiology*. – 2011. – Vol. 156. – P. 1548-1555.

210 Odokonyero D., Mendoza M.R., Alvarado V.Y., Zhang J., Wang X., Scholthof H.B. Transgenic down-regulation of Argonaute 2 expression in *Nicotiana benthamiana* interferes with several layers of antiviral defenses // *Virology*. – 2015. – Vol. 486. – P. 209-218.

211 Ruiz-Ruiz S., Soler N., Sánchez-Navarro J., Fagoaga C., López C., Navarro L., Moreno P., Peña L., Flores R. Citrus tristeza virus p23: determinants for nucleolar localization and their influence on suppression of RNA silencing and pathogenesis // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2013. – Vol. 26. – P. 306-318.

212 Gómez-Muñoz N., Velázquez K., Vives M.C., Ruiz-Ruiz S., Pina J.A., Flores R., Moreno P., Guerri J. The resistance of sour orange to Citrus tristeza virus is mediated by both the salicylic acid and the RNA silencing defense pathways // *Molecular Plant Pathology*. – 2017. – Vol. 18. – P. 1253-1266.

213 Varanda C.M.R., Materatski P., Campos M.D., Clara M.I.E., Nolasco G., Félix M.R. Olive mild mosaic virus coat protein and P6 are suppressors of RNA silencing, and their silencing confers resistance against OMMV // *Viruses*. – 2018. – Vol. 10. – P. 416.

214 Cui H., Wang A. Plum pox virus 6K1 protein is required for viral replication and targets the viral replication complex at the early stage of infection // *Journal of Virology*. – 2016. – Vol. 90. – P. 5119-5131.

215 Cui X., Yaghmaiean H., Wu G., Wu X., Chen X., Thorn G., Wang A. The C-terminal region of the turnip mosaic virus P3 protein is essential for viral infection via targeting P3 to the viral replication complex // *Virology*. – 2017. – Vol. 510. – P. 147-155.

216 Silhavy D., Molnar A., Lucioli A., Szittyá G., Hornyik C., Tavazza M., Burgyan J. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide doublestranded RNAs // *EMBO Journal*. – 2002. – Vol. 21. – P. 3070-3080.

217 Lakatos L., Csorba T., Pantaleo V., Chapman E.J., Carrington J.C., Liu Y.P., Dolja V.V., Calvino L.F., Lopez-Moya J.J., Burgyan J. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors // *EMBO Journal*. – 2006. – Vol. 25. – P. 2768-2780.

218 Lozsa R., Csorba T., Lakatos L., Burgyan J. Inhibition of 3' modification of small RNAs in virus-infected plants require spatial and temporal co-expression of small RNAs and viral silencing-suppressor proteins // *Nucleic Acids Research*. – 2008. – Vol. 36. – P. 4099-4107.

219 Glick E., Zrachya A., Levy Y., Mett A., Gidoni D., Belausov E., Citovsky V., Gafni Y. Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein // *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. – 2008. – Vol. 105. – P. 157-161.

220 Okano Y., Senshu H., Hashimoto M., Neriya Y., Netsu O., Minato N., Yoshida T., Maejima K., Oshima K., Komatsu K., Yamaji Y., Namba S. *In planta* recognition of a double-stranded RNA synthesis protein complex by a Potexviral RNA silencing suppressor // *Plant Cell*. – 2014. – Vol. 26. – P. 2168-2183.

- 221 Li F., Huang C., Li Z., Zhou X. Suppression of RNA silencing by a plant DNA virus satellite requires a host calmodulin-like protein to repress RDR6 expression // *PLoS Pathogens*. – 2014. – Vol. 10. – e1003921.
- 222 Ren B., Guo Y., Gao F., Zhou P., Wu F., Meng Z., Wei C., Li Y. Multiple functions of Rice dwarf phyto-reovirus Pns10 in suppressing systemic RNA silencing // *Journal of Virology*. – 2010. – Vol. 84. – P. 12914-12923.
- 223 Sudarshana M.R., Roy G., Falk B.W. Methods for engineering resistance to plant viruses // *Methods of Molecular Biology*. – 2007. – Vol. 354. – P. 183-195.
- 224 Abel P.P., Nelson R.S., De B., Hoffmann N., Rogers S.G., Fraley R.T., Beachy R.N. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene // *Science*. – 1986. – Vol. 232, №4751. – P. 738-743.
- 225 Cooper B., Lapidot M., Heick J. A., Dodds J. A., Beachy, R. N. A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility // *Virology*. – 1995. – Vol. 206. – P. 307-313.
- 226 Duan Y.P., Powell C.A., Purcifull D.E., Broglio P., Hiebert E. Phenotypic variation in transgenic tobacco expressing mutated geminivirus movement/pathogenicity (BC1) proteins // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 1997. – Vol. 10. – P. 1065-1074.
- 227 Hou Y.M., Sanders R., Ursin V.M., Gilbertson R.L. Transgenic plants expressing geminivirus movement proteins: abnormal phenotypes and delayed infection by Tomato mottle virus in transgenic tomatoes expressing the Bean dwarf mosaic virus BV1 or BC1 proteins // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2000. – Vol. 13. – P. 297-308.
- 228 Hammond S.M., Bernstein E., Beach D., Hannon G.J. An RNA directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells // *Nature*. – 2000. – Vol. 404. – P. 293-296.
- 229 van der Vlugt R.A., Ruiter R.K., Goldbach R. Evidence for sense RNA-mediated protection to PVY^N in tobacco plants transformed with the viral coat protein cistron // *Plant Molecular Biology*. – 1992. – Vol. 20. – P. 631-639.
- 230 Lindbo J., Silva-Rosales L., Proebsting W., Dougherty W. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for regulation of gene expression and virus resistance // *Plant Cell*. – 1993. – Vol. 5. – P. 1749-1759.
- 231 Tenllado F., Llave C., Diaz-Ruiz, J.R. RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants // *Virus Research*. – 2004. – Vol. 102. – P. 85-96.
- 232 Wilson T.M.A. Strategies to protect crop plants against viruses: Pathogen-derived resistance blossoms // *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. – 1993. – Vol. 90. – P. 3134-3141.
- 233 Beachy R.N., Loesch-Fries S., Tumer N.E. Coat protein-mediated resistance against virus infection // *Annual Review of Phytopathology*. – 1990. – Vol. 28. – P. 451-474.
- 234 Powell P.A., Stark D.M., Sanders P.R., Beachy R.N. Protection against tobacco mosaic virus in transgenic plants that express tobacco mosaic virus antisense

RNA // Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. – 1989. – Vol. 86. – P. 6949-6952.

235 Powell P.A., Sanders P.R., Tumer N., Fraley R.T., Beachy R.N. Protection against tobacco mosaic virus infection in transgenic plants requires accumulation of coat protein rather than coat protein RNA sequences // Virology. – 1990. – Vol. 175. – P. 124-130.

236 Register J.C. 3rd, Beachy R.N. Resistance to TMV in transgenic plants results from interference with an early event in infection // Virology. – 1988. – Vol. 166. – P. 524-532.

237 Lindbo J.A., Dougherty W.G. Pathogen-derived resistance to a potyvirus: immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 1992. – Vol. 5. – P. 144-153.

238 Tepfer M. Risk-assessment of virus-resistant transgenic plants // Annual Review of Phytopathology. – 2002. – Vol. 40. – P. 467-491.

239 Gonsalves D. Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study // Annual Review of Phytopathology. – 1998. – Vol. 36. – P. 415-437.

240 Golemboski D.B., Lomonossoff G.P., Zaitlin M. Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus // Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. – 1990. – Vol. 87. – P. 6311-6315.

241 Nguyen F., Lucas W.J., Ding B., Zaitlin M. Viral RNA trafficking is inhibited in replicase-mediated resistant transgenic tobacco plants // Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. – 1996. – Vol. 93. – P. 12643-12647.

242 Morano M.R., Baulcombe D. Pathogen-derived resistance targeted against the negative-strand RNA of tobacco mosaic virus: RNA strand-specific gene silencing? // Plant Journal. – 1998. – Vol. 13. – P. 537-546.

243 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (дата обращения 26.09.2022)

244 Sambrook J., Russel D.W. Molecular cloning: A laboratory manual: 3 volumes. Third edition. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – p. 2345.

245 Nie X., Singh R.P. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers // Journal of Virological Methods. – 2001. – Vol. 91. – P. 37-49.

246 Matoušek J., Schubert J., Didic P. A broad variability of potato S carlavirus (PVS) revealed by analysis of RT-PCR-amplified virus sequences // Canadian Journal of Plant Pathology. – 2000. – Vol. 22. – P. 29-37.

247 Alexandrova A.M., Karpova O.V., Nargilova R.M., Kryldakov R.V., Nizkorodova A.S., Zhigaylov A.V., Yekaterinskaya E.M., Kushnarenko S.V., Akbergenov R.Zh., Iskakov B.K. Distribution of potato (*Solanum tuberosum*) viruses in Kazakhstan // International Journal of Biology and Chemistry. – 2018. – Vol. 11, №1. – P. 33-40.

248 Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochemical Bulletin. – 1987. – Vol. 19. – P. 11-15.

- 249 Golyaev V., Candresse T., Rabenstein F., Pooggin M.M. Plant virome reconstruction and antiviral RNAi characterization by deep sequencing of small RNAs from dried leaves // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – 19268.
- 250 Malpica-López N., Rajeswaran R., Beknazariants D., Seguin J., Golyaev V., Farinelli L., Pooggin M.M. Revisiting the roles of tobamovirus replicase complex proteins in viral replication and silencing suppression // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2018. – Vol. 31. – P. 125-144.
- 251 Alexandrova A., Karpova O., Kryldakov R., Golyaev V., Nargilova R., Iskakov B., Pooggin M.M. Virus elimination from naturally infected field cultivars of potato (*Solanum tuberosum*) by transgenic RNA interference // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – 8020.
- 252 Turco S., Golyaev V., Seguin J., Gilli C., Farinelli L., Boller T., Schumpp O., Pooggin M.M. Small RNA-omics for virome reconstruction and antiviral defense characterization in mixed infections of cultivated *Solanum* plants // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2018. – Vol. 31. – P. 707-723.
- 253 Seguin J., Otten P., Baerlocher L., Farinelli L., Pooggin M.M. MISIS-2: A bioinformatics tool for in-depth analysis of small RNAs and representation of consensus master genome in viral quasispecies // *Journal of Virological Methods*. – 2016. – Vol. 233. – P. 37-40.
- 254 Гавриленко Т.А., Рогозина Е.В., Антонова О.А. Создание устойчивых к вирусам растений картофеля на основе традиционных подходов и методов биотехнологии. – Идентифицированный генофонд растений и селекция. СПб., 2005. – с. 644-662.
- 255 Красавин В.Ф. Селекция картофеля на юго-востоке Казахстана. – Алматы, «Онер», 2009. – с. 224.
- 256 Аскарлова М.А., Манадилова А., Садвакасова Г.Г., Кунаева Р.М., Лобенштайн Г. Исследование картофельных полей Казахстана на вирусное заражение // *Биотехнология. Теория и практика*. – 1997. – №2. – С. 26-32.
- 257 Манадилова А.М., Садвакасова Г.Г., Бекельман Е., Лобенштайн Г. Диагностика Y-вируса картофеля методом иммуноферментного анализа // *Биотехнология. Теория и практика*. – 1998. – № 3. – С. 50-54.
- 258 Садвакасова Г.Г., Бекельман Е., Лобенштайн Г. Очистка вируса S картофеля из *Chenopodium amaranticolor* и его детекция иммуноферментным методом // *Биотехнология. Теория и практика*. – 1997. – №2. – С. 33-38.
- 259 Оспанова Г.С., Бозшатаева Г.Т., Турабаева Г.К., Алиханова А. Вирусные болезни пасленовых в Казахстане // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. Сельскохозяйственные науки*. – 2014. – №3. – С. 62-64.
- 260 Кузьмина Г.Н., Акзамбек А.М., Кабатаева Ж.К. Зараженность картофеля вирусными инфекциями в Восточном Казахстане // *Материалы XLI Международной научно-практической конференции КазАТК им. М. Тынышпаева на тему: «Инновационные технологии на транспорте: образование, наука, практика», 3-4 апреля 2017 г.* – Том 1. – С. 520-523.

- 261 Vallejo D.C., Gutiérrez S.P.A., Marin M.M. Genome characterization of a Potato virus S (PVS) variant from tuber sprouts of *Solanum phureja* Juz. et Buk. // *Agronomía Colombiana*. – 2016. – Vol. 34, №1. – P. 51-60.
- 262 Апушев А.К., Екатеринбургская Е.М., Александрова А.М. Разнообразие вирусов картофеля рода Carlavirus в Костанайской области // Многопрофильный научный журнал Костанайского государственного университета им. А. Байтурсынова «3i: интеллект, идея, инновация». – 2019. – №1. – С. 60-67.
- 263 Karpova O., Alexandrova A., Nargilova R., Kryldakov R., Yekaterinskaya E., Romadanova N., Kushnarenko S., Iskakov B. Diagnosis of potato viruses in Kazakhstan: molecular characterization of isolates // *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*. – 2019. – №1. – P. 58-67.
- 264 Karpova O., Alexandrova A., Yeriskina E., Kryldakov R., Gritsenko D., Galiakparov N., Iskakov B. Andean and ordinary strains of Potato Virus S infecting potatoes in Southern Kazakhstan // *Plant Disease*. – 2020. – Vol. 104, №2. – P. 599.
- 265 https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=plant_vectors&plasmid=pBI221 (дата обращения 19.05.2022)
- 266 https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=plant_vectors&plasmid=pBin19 (дата обращения 19.05.2022)
- 267 Senshu H., Yamaji Y., Minato N., Shiraishi T., Maejima K., Hashimoto M., Miura C., Neriya Y., Namba S. A dual strategy for the suppression of host antiviral silencing: two distinct suppressors for viral replication and viral movement encoded by potato virus M // *Journal of Virology*. – 2011. – Vol. 85, №19. – P. 10269-10278.
- 268 Kryldakov R., Akbergenov R., Hohn T., Iskakov B. Identification of silencing suppressors of Potato Virus M // *Journal of Cell and Molecular Biology*. – 2011. – Vol. 9. – P. 15-20.
- 269 Chapman E.J., Prokhnevsky A.I., Gopinath K., Dolja V.V., Carrington J.C. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step // *Genes & Development*. – 2004. – Vol. 18. – P. 1179-1186.
- 270 Yu B., Chapman E.J., Yang Z., Carrington J.C., Chen X. Transgenically expressed viral RNA silencing suppressors interfere with microRNA methylation in *Arabidopsis* // *FEBS Letters*. – 2006. – Vol. 580, №13. – P. 3117-3120.
- 271 Del Toro F.J., Donaire L., Aguilar E., Chung B.-N., Tenllado F., Canto T. Potato virus Y HC-Pro suppression of antiviral silencing in *Nicotiana benthamiana* plants correlates with its ability to bind *in vivo* to 21- and 22-nucleotide small RNAs of viral sequence // *Journal of Virology*. – 2017. – Vol. 91, №12. – e00367-17.
- 272 Hussain M.D., Farooq T., Chen X., Tariqjaveed M., Jiang T., Liu S., Zhou T. Viral suppressors from members of the family *Closteroviridae* combating antiviral RNA silencing: a tale of a sophisticated arms race in host-pathogen interactions // *Phytopathology Research*. – 2021. – Vol. 3, №27. – P.265-272.
- 273 Senshu H., Ozeki J., Komatsu K., Hashimoto M., Hatada K., Aoyama M., Kagiwada S., Yamaji Y., Namba S. Variability in the level of RNA silencing suppression caused by triple gene block protein 1 (TGBp1) from various potexviruses during infection // *Journal of General Virology*. – 2009. – Vol. 90. – P. 1014-1024.
- 274 Turner R.L., Glynn M., Taylor S.C., Cheung M.K., Spurr C., Twell D., Foster G.D. Analysis of a translational enhancer present within the 5'-terminal

sequence of the genomic RNA of potato virus S // Archives of Virology. – 1999. – Vol. 144, №7. – P. 1451-1461.

275 Prins M., Laimer M., Noris E., Schubert J., Wassenegger M., Tepfer M. Strategies for antiviral resistance in transgenic plants // Molecular Plant Pathology. – 2008. – Vol. 9, №1. – P. 73-83.

276 Ramesh J.P., Chandrakant E.S., Sahebrao W.Y. RNAi induced gene silencing journey from simple dsRNA to high-throughput intron hairpin RNA construct in crop improvement. In Genetic Transformation in Crops. – London: IntechOpen, 2020.

277 Hameed A., Tahir M.N., Asad S., Bilal R., Van Eck J., Jander G., Mansoor S. RNAi-mediated simultaneous resistance against three RNA viruses in potato // Molecular Biotechnology. – 2017. – Vol. 59. – P. 73-83.

278 https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=plant_vectors&plasmid=pCAMBIA2300&format=png (дата обращения 26.09.2022)

279 Liao Z., Hodén K.P., Singh R.K., Dixelius C. Genome-wide identification of Argonautes in Solanaceae with emphasis on potato // Scientific Reports. – 2020. – Vol. 10. – P. 20577.

280 Fang X., Qi Y., RNAi in plants: an Argonaute-centered view // The Plant Cell. – 2016. – Vol. 28, №2. – P. 272-285.

281 Fuentes A., Carlos N., Ruiz Y., Callard D., Sánchez Y., Ochagavía M.E., Seguin J., Malpica-López N., Hohn T., Lecca M.R., Pérez R., Doreste V., Rehrauer H., Farinelli L., Pujol M., Pooggin M.M. Field trial and molecular characterization of RNAi-transgenic tomato plants that exhibit resistance to Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2016. – Vol. 29. – P. 197-209.

282 Leibman D., Wolf D., Saharan V., Zelcer A., Arazi T., Yoel S., Gaba V., Gal-On A. A high level of transgenic viral small RNA is associated with broad Potyvirus resistance in cucurbits // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2011. – Vol. 24. – P. 1220-1238.

283 Zhao D., Song G. High-throughput sequencing as an effective approach in profiling small RNAs derived from a hairpin RNA expression vector in woody plants // Plant Science. – 2014. – Vol. 228. – P. 39-47.

284 Zhao D., Song G. Rootstock-to-scion transfer of transgene-derived small interfering RNAs and their effect on virus resistance in nontransgenic sweet cherry // Plant Biotechnology Journal. – 2014. – Vol. 12. – P. 1319-1328.

285 Montes C., Castro Á., Barba P., Rubio J., Sánchez E., Carvajal D., Aguirre C., Tapia E., Dell'Orto P., Decroocq V., Prieto H. Differential RNAi responses of *Nicotiana benthamiana* individuals transformed with a hairpin-inducing construct during Plum pox virus challenge // Virus Genes. – 2014. – Vol. 49. – P. 325-338.

286 Pooggin M.M. RNAi-mediated resistance to viruses: a critical assessment of methodologies // Current Opinion in Virology. – 2017. – Vol. 26. – P. 28-35.