

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Государственный научный центр Российской Федерации

ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук

(ГНЦ ИБХ РАН)

На правах рукописи

Самарская Виктория Олеговна

**Биоинженерия устойчивости растений к вирусам с использованием
экзогенной двуцепочечной РНК**

1.5.6 Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Тальянский Михаил Эммануилович

Москва - 2026

Содержание

Список сокращений	3
Введение	5
1. Обзор литературы	15
1.1. Вирусные заболевания картофеля.....	15
1.2. Вирус картофеля Y и его генетическое разнообразие	17
1.3. Иммуитет картофеля к вирусам и роль РНК-интерференции	26
1.4. Экзогенное применение дцРНК и малые РНК в противовирусном ответе растений.....	40
2. Материалы и методы	50
3. Результаты и обсуждение	64
3.1. Влияние экзогенной PVY-специфической двуцепочечной РНК на накопление вируса картофеля Y в растениях <i>S. tuberosum</i>	64
3.2. Молекулярные механизмы действия экзогенной PVY - специфической дцРНК в индукции иммунных реакций у растений картофеля	67
3.3. Анализ профиля малых РНК в листьях <i>S. tuberosum</i> после экзогенного применения PVY - специфической дцРНК.....	77
3.4. Генетическое разнообразие изолятов вируса картофеля Y и его использование для оптимизации дизайна PVY - специфической дцРНК.....	83
Заключение	97
Выводы	100
Список литературы	102

Список сокращений

дпи/dpi – дни после инфицирования/days post infection;
 дцРНК – двуцепочечная РНК;
 кДНК – комплементарная ДНК;
 siRNA – малые интерферирующие РНК (миРНК);
 ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;
 ПЦР-РВ – ПЦР в режиме реального времени;
 РНКи – РНК-интерференция (RNAi);
 dH₂O – дистиллированная вода;
 ER – сверхустойчивость (extreme resistance);
 ETI – иммунитет, индуцируемый эффекторами (effector-triggered immunity);
 HC-Pro – вспомогательный компонент-протеиназа (helper component-proteinase);
 HR – гиперчувствительный ответ (hypersensitive response);
 LRR – лейцин-богатый повтор (leucine-rich repeat);
 mQ – вода, очищенная от ионов и примесей, полученная на Системе очистки воды Milli-Q, Millipore;
 PAMP – молекулярные паттерны ассоциированные с патогенами (pathogen-associated molecular pattern);
 PTI – паттерн-индуцированный иммунитет (patterns-triggered immunity);
 VPg – вирусный белок, связанный с геномом (viral protein genome linked);
 AGO (Argonaute) – белки, каталитические компоненты RISC;
 VSR – рецепторы вакуолярной сортировки;
 ViSP – периплазматический белок, связанный с вирулентностью и стрессом;
 ARF – транскрипционный фактор, участвующий в передаче ауксина;
 PARP – поли(АДФ-рибоза)-полимераза;
 PARG – поли(АДФ-рибоза) гликогидролаза;
 АФК – активные формы кислорода;
 АВА – абсцизовая кислота;
 SA – салициловая кислота;
 АДФ – аденозиндифосфат;
 миРНК, miRNA – микроРНК;
 sgRNA – однонаправленная гидовая РНК;
 ГМО – генетически модифицированный организм;
 дцРНК_{rvu} – двуцепочечная РНК к Y вирусу картофеля;
 дцРНК_{rvs} – двуцепочечная РНК к S вирусу картофеля;
 PRR – рецепторы распознавания образов;
 RdRp – РНК-зависимая РНК-полимераза;
 RISC – РНК-индуцируемый комплекс;
 DICER – рибонуклеаза из семейства РНКазы III;
 DCL – Dicer-подобный белок;
 tasiRNA – транс-действующая малая интерферирующая РНК;
 atasiRNA – искусственно сконструированные tasiРНК;

circRNA – кольцевые РНК;

hpRNA – РНК со шпилечной структурой (двухцепочечный участок и петля);

JA – жасмоновая кислота;

RNA-seq – РНК-секвенирование, метод высокопроизводительного секвенирования для анализа транскриптома.

Названия фитопатогенов:

PVY – вирус картофеля Y (*Potato virus Y*);

MMoV – вирус легкой крапчатости перца (*Mirabilis mosaic virus*);

PSTVd – вириод веретеновидности клубней картофеля (*Potato spindle tuber viroid*);

CEVd – вириод экзокортициса цитрусовых (*Pospiviroid exocortiscitri*);

СChMVd – вириод хлоротичной пятнистости хризантемы (*Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*);

CMV – вирус мозаики огурца (*Cucumber mosaic virus*);

OSMV – вирус полосатой мозаики овса (*Wheat streak mosaic rymovirus*);

PPV – вирус оспы сливы (*Plum pox virus*);

RSV – вирус полосатости риса (*Rice stripe virus*);

PVA – вирус картофеля A (*Potato virus A*);

PVX – вирус картофеля X (*Potato virus X*);

PVS – вируса картофеля S (*Potato virus S*);

PVM – вирус картофеля M (*Potato virus M*);

PVP – вирус картофеля P (*Potato virus P*);

PLRV – вирус скручивания листьев картофеля (*Potato leafroll virus*);

RBSDV – вирус чернополосой карликовости риса (*Rice black-streaked dwarf virus*);

TYLCV – вирус желтой курчавости листьев томата (*Tomato yellow leaf curl virus*);

TSWV – вирус пятнистого увядания томата (*Tomato spotted wilt virus*);

WSMV – вирус полосатой мозаики пшеницы (*Wheat streak mosaic virus*);

WDV – вирус карликовости пшеницы (*Wheat dwarf virus*).

Введение

Вирусные заболевания растений с момента зарождения сельского хозяйства являются одной из наиболее серьёзных угроз продовольственной безопасности. В условиях глобальных изменений климата, расширения ареалов переносчиков и интенсификации агротехнологий частота и масштаб вспышек вирусных инфекций в агроценозах неуклонно возрастают. Это приводит к значительным потерям урожайности и снижению качества сельскохозяйственной продукции, формируя новые вызовы для устойчивого растениеводства и требуя разработки инновационных, экологически безопасных средств защиты.

Современные подходы к борьбе с вирусными болезнями растений включают использование устойчивых сортов, агротехнические приёмы и химическую защиту. Традиционная селекция остаётся надёжным инструментом создания вирусоустойчивых культур, однако требует значительных временных и материальных затрат и многолетнего мониторинга популяций патогенов. Даже внедрение маркер-опосредованной селекции и биоинформатических методов не полностью решает проблему оперативного реагирования на появление новых штаммов и рекомбинантных вариантов вирусов, способных преодолевать существующие гены устойчивости.

Заметный прогресс в области защиты растений от вирусных инфекций связан с развитием технологий редактирования генома, в первую очередь систем CRISPR/Cas. РНК-направляемые эндонуклеазы, включая Cas13, продемонстрировали эффективность в подавлении вирусных РНК и формировании устойчивости к широкому спектру фитопатогенных вирусов. Однако данные подходы предполагают внесение изменений в геном растения и требуют сложных процедур регенерации трансгенных или геномно-редактированных линий. Это существенно ограничивает их применение в полевых условиях, а также связано с регуляторными ограничениями и критическим общественным восприятием генетически модифицированных организмов.

Альтернативой трансгенным стратегиям являются РНК-технологии, основанные на механизмах РНК-интерференции (РНКи/RNAi). Применение двуцепочечной РНК (дцРНК) позволяет специфически подавлять экспрессию генов вирусов или собственных генов растения, вовлечённых во взаимодействие с патогеном. Экзогенное нанесение дцРНК даёт возможность индуцировать защитные механизмы без изменения генома растения. Такие подходы обладают рядом важных преимуществ: позволяют обратимо и контролируемо регулировать экспрессию генов на определённых стадиях вегетации; обеспечивают прямую защиту от вирусов путём деградации их геномных РНК; могут быть оперативно адаптированы под новые штаммы; не требуют трудоёмких процедур получения трансгенных растений и рассматриваются как более экологически безопасные и социально приемлемые.

Вместе с тем, несмотря на активное развитие РНК-основных технологий, механизмы действия экзогенной дцРНК в растениях до конца не изучены. Остаётся недостаточно ясно, какие компоненты РНК-силансинга и врождённого иммунитета вовлекаются в ответ на экзогенную вирусспецифическую дцРНК, каковы особенности профиля малых РНК, формирующихся в этих условиях, и в какой мере такие реакции зависят от генотипа растения и свойств конкретного вируса. Особый интерес представляет возможная двойная роль дцРНК — как триггера RNAi и как молекулярного паттерна, активирующего паттерн-индуцированный врождённый иммунитет (PTI).

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) является одной из ключевых продовольственных культур в России и мире, а вирус Y картофеля (Potato virus Y, PVY) — одним из наиболее экономически значимых его патогенов. Инфекция PVY приводит к снижению урожайности, ухудшению качества клубней и деградации семенного материала. Высокая генетическая вариабельность PVY, наличие нескольких штаммов и рекомбинантных вариантов, а также активная передача тлями существенно затрудняют

контроль инфекции. Для разработки эффективных и устойчивых стратегий защиты востребована информация как о молекулярных механизмах противовирусного ответа картофеля, так и о генетическом разнообразии популяций PVY, циркулирующих в различных регионах Российской Федерации.

В этих условиях особую актуальность приобретает исследование экзогенных вирусспецифических дцРНК как инструмента индукции противовирусной устойчивости картофеля к PVY. Представляет научный и практический интерес оценка влияния такой дцРНК на накопление вирусной РНК в растениях, выяснение связи между её действием и активацией защитных реакций, а также анализ состава и распределения малых РНК, формирующихся в ответ на обработку. Не менее важной задачей является изучение генетического разнообразия изолятов PVY, циркулирующих в различных агроклиматических регионах России, с использованием современных методов высокопроизводительного секвенирования.

С учётом изложенного, данное исследование направлено на углублённое изучение механизмов действия экзогенной PVY-специфической двуцепочечной РНК в растениях картофеля и на анализ генетического разнообразия популяций PVY, что в совокупности создаёт научную основу для разработки новых РНК-основных средств защиты картофеля от вирусных инфекций.

Цель работы: изучить влияние экзогенной вирусспецифической дцРНК на индукцию устойчивости растений картофеля к вирусу картофеля Y и связанные с этим защитные реакции растений, а также исследовать генетический состав вариантов вируса картофеля Y и их распространение в регионах РФ.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние экзогенной обработки растений картофеля дцРНК на уровень накопления вирусной РНК в растениях картофеля.

2. Определить взаимосвязь между механизмом действия PVY-специфичной дцРНК и активацией защитных реакций у растений картофеля.
3. Исследовать состав и распределение малых РНК в листьях картофеля после экзогенного применения PVY-специфичной дцРНК.
4. Проанализировать генетическое разнообразие вариантов вируса картофеля Y в РФ и провести дизайн универсальной вирусспецифической дцРНК.

Предмет исследования: молекулярные реакции растений картофеля на вирусную инфекцию при экзогенном применении вирусспецифической дцРНК.

Объекты исследования: растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.).

Актуальность исследования.

Вирус картофеля Y (Potato virus Y, PVY) является одним из наиболее распространённых и экономически значимых фитопатогенов в мировой картофелеводческой отрасли. Инфекция PVY приводит к снижению урожайности на 10–80 % в зависимости от сорта, агроклиматических условий и циркулирующих штаммов вируса, а также к ухудшению качества семенного материала и товарной продукции. Современные методы контроля PVY, включая использование устойчивых сортов, борьбу с тлями-переносчиками и фитосанитарный мониторинг, часто оказываются недостаточно эффективными вследствие высокой генетической изменчивости вируса, появления новых рекомбинантных штаммов и способности PVY преодолевать механизмы устойчивости растений.

В условиях реализации глобальной стратегии устойчивого развития растениеводства ключевой задачей является замена химических пестицидов экологически безопасными и биологически обоснованными средствами защиты растений. В этом контексте в последние годы возрастает интерес к экзогенному применению двуцепочечной РНК (дцРНК) как перспективному направлению защиты растений от вирусов. ДцРНК может запускать

механизмы РНК-интерференции и тем самым обеспечивать специфическую деградацию вирусной РНК. Однако механизмы действия экзогенной дцРНК у растений до конца не изучены. Остаётся неясным, какие пути врождённого иммунитета активируются при её восприятии, какова роль малых РНК различного происхождения в формировании противовирусной защиты, а также насколько устойчив этот ответ при различных условиях заражения. Кроме того, недостаточно изучены характеристики малых РНК, образующихся при обработке растений дцРНК, и их вклад в защитные реакции растений.

Нетрансгенные подходы, основанные на экзогенном применении дцРНК, привлекают внимание благодаря высокой специфичности, эффективности и отсутствию генетической модификации растений. Развитие биотехнологических систем производства дцРНК создаёт предпосылки для их практического применения в растениеводстве. Вместе с тем разработка универсальных дцРНК против PVY ограничена недостатком данных о генетическом разнообразии популяций вируса, циркулирующих на территории РФ.

Таким образом, исследование влияния экзогенной дцРНК на устойчивость картофеля к вирусу, анализ индуцированных ей механизмов противовирусного иммунитета растений, а также изучение генетического состава популяций PVY в различных районах регионах РФ является актуальными научными проблемами. Их решение создаёт основу для разработки новых биотехнологических подходов защиты картофеля от вирусной инфекции.

Научная новизна.

В работе получены новые данные о влиянии экзогенной вирусспецифической двуцепочечной РНК на развитие инфекции вируса Y картофеля и формирование противовирусной устойчивости у растений картофеля. Установлено, что экзогенная PVY-специфичная дцРНК может выполнять двойную функцию: инициировать вирусспецифическую РНК-

интерференцию (RNAi) и способствовать деградации геномов PVY, а также служить молекулярным паттерном, активирующим компоненты паттерн-индуцированного врождённого иммунитета (PTI). Такое сочетание функций расширяет современные представления о роли дцРНК как сигнальной молекулы в противовирусной защите растений.

Метагеномное секвенирование малых РНК выявило неканоническое распределение популяций вирусспецифичных малых интерферирующих РНК (миРНК), формирующихся после экзогенного введения дцРНК. Эти данные указывают на возможное привлечение DCL-независимых или альтернативных путей биогенеза малых РНК, что ранее не описано для реакции картофеля на PVY и открывает новые направления исследований механизмов РНК-силансинга.

В работе получены расширенные данные о генетическом разнообразии популяций PVY, циркулирующих на территории Российской Федерации. На основе высокопроизводительного секвенирования РНК из растений картофеля, естественно заражённых тлями-переносчиками и проростков клубней, полученных от полевых растений, выполнена классификация изолятов PVY, выявлены особенности их распределения и соотношения вирусных штаммов в различных климатических регионах.

Исследование включало образцы 14 сортов картофеля из 19 регионов РФ, относящихся к 7 федеральным округам. Такое широкое географическое покрытие обеспечило репрезентативную выборку изолятов и позволило проанализировать влияние климатических факторов на циркуляцию и генетическую структуру PVY.

Дополнительно получены новые данные о связи между экзогенным применением дцРНК, изменениями в профиле малых РНК и активацией иммунных путей картофеля, что уточняет предполагаемые механизмы экзогенно индуцированной устойчивости и дополняет существующие модели противовирусного иммунитета растений.

Область применения и практическая значимость исследования.

Ожидаемые результаты исследования имеют прикладное значение для разработки инновационных РНК-технологий в функциональной геномике и защите растений. Полученные данные могут использоваться при создании экзогенных противовирусных препаратов на основе дцРНК, способных заменить химические пестициды и сократить использование ГМО-технологий. Анализ природных популяций вируса PVY позволит оптимизировать дизайн универсальных препаратов на основе дцРНК для применения в различных агроклиматических зонах России.

Практическая реализация полученных результатов способствует развитию экологически безопасного растениеводства и внедрению биотехнологических систем защиты культур, соответствующих приоритетам научно-технологического развития Российской Федерации.

Личный вклад автора.

Автор самостоятельно выполнил анализ современного состояния проблемы, сформулировал цели и задачи исследования, провёл сбор, обработку и интерпретацию экспериментальных данных. Все основные результаты и выводы получены автором лично или при его непосредственном участии. По материалам исследования опубликованы статьи в рецензируемых журналах и представлены доклады на научных конференциях. Участие соавторов в отдельных этапах исследования надлежащим образом отражены в публикациях.

Положения, выносимые на защиту:

1. Экзогенная PVY-специфическая дцРНК обеспечивает ингибирование репликации PVY в растениях картофеля, что подтверждает эффективность механизма РНК-интерференции, индуцированного при опрыскивании листьев растений.

2. Экзогенное применение PVY-специфической дцРНК индуцирует не только РНК-интерференцию, но и координированную активацию базовых защитных механизмов растения, включая паттерн-индуцированный иммунитет (РТИ) и изменения, ассоциированные с метаболизмом, поли(АДФ-

рибозы), что приводит к формированию интегрированного многоуровневого противовирусного ответа.

3. Экзогенное внесение PVY-специфической дцРНК индуцирует образование неканонического пула малых РНК длиной от 18 до 30 нт, которое коррелирует с подавлением вирусной инфекции, указывая на возможное вовлечение DCL-независимых или ранее не охарактеризованных механизмов в противовирусном ответе растения.

4. Популяции PVY, циркулирующие в различных регионах РФ, характеризуются высоким уровнем рекомбинационной вариабельности и представлены исключительно рекомбинантами, относящимися к типам PVY^{Eu-N} и PVY^O.

5. Учёт природного генетического разнообразия PVY позволяет осуществлять рациональный дизайн универсальных дцРНК, нацеленных на консервативные участки генома и обладающих расширенным спектром противовирусного действия.

Список публикаций по теме диссертации.

Достоверность результатов работы подтверждается статистическим анализом данных и наличием биологических повторов. Материалы диссертационной работы были опубликованы в 6 статьях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных системах цитирования:

1. **В.О. Самарская**, Ф.А. Бутырин, Т.П. Супрунова, Н.А. Спеченкова, М.Э. Тальянский, Н.О. Калинина. Распространение и генетическое разнообразие вирусов картофеля в регионах России. *Acta Naturae*. 2026, 18(1):91-103. doi: 10.32607/actanaturae.27830.
2. **Samarskaya V**, Kuznetsova M, Gryzunov N, Spechenkova N, Bagdasarova P, Ryabov EV, Taliansky M, Kalinina NO. Identification of Two Novel Recombinant Types of Potato Virus Y from *Solanum tuberosum* Plants in the Southern Region of Russia. *Plant Dis*. 2025 May;109(5):998-1003. doi: 10.1094/PDIS-10-24-2151-SC.

3. **Samarskaya VO**, Spechenkova N, Ilina I, Suprunova TP, Kalinina NO, Love AJ, Taliansky ME. A Non-Canonical Pathway Induced by Externally Applied Virus-Specific dsRNA in Potato Plants. *Int J Mol Sci.* 2023 Oct 30;24(21):15769. doi: 10.3390/ijms242115769.
4. **Samarskaya VO**, Ryabov EV, Gryzunov N, Spechenkova N, Kuznetsova M, Ilina I, Suprunova T, Taliansky ME, Ivanov PA, Kalinina NO. The Temporal and Geographical Dynamics of Potato Virus Y Diversity in Russia. *Int J Mol Sci.* 2023 Oct 2;24(19):14833. doi: 10.3390/ijms241914833.
5. **Samarskaya VO**, Spechenkova N, Markin N, Suprunova TP, Zavriev SK, Love AJ, Kalinina NO, Taliansky M. Impact of Exogenous Application of Potato Virus Y-Specific dsRNA on RNA Interference, Pattern-Triggered Immunity and Poly(ADP-ribose) Metabolism. *Int J Mol Sci.* 2022 Jul 18;23(14):7915. doi: 10.3390/ijms23147915.
6. Taliansky M, **Samarskaya V**, Zavriev SK, Fesenko I, Kalinina NO, Love AJ. RNA-Based Technologies for Engineering Plant Virus Resistance. *Plants (Basel).* 2021 Jan 2;10(1):82. doi: 10.3390/plants10010082.

Результаты работ были представлены на XI Международной конференции молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков (2022, Новосибирск, Россия); на V Международной научной конференции "Наука будущего-наука молодых" (2023, Орёл, Россия); на XXXV зимней молодёжной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (2023, Москва, Россия); на 5-ом Всероссийском конгрессе по защите растений (2024, Санкт-Петербург, Россия); на 14-ой Международной мультikonференции «Биоинформатика регуляции и структуры геномов/системная биология» (2024, Новосибирск, Россия) и на Международной научной конференции «Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений» (2025, Новосибирск, Россия).

Структура и объем диссертации.

Материалы диссертации изложены на 115 страницах машинописного текста и включают 23 рисунка и 3 таблицы. Диссертация состоит из разделов: Список сокращений, Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Выводы, Список литературы. Список литературы содержит 144 источника.

1. Обзор литературы

1.1. Вирусные заболевания картофеля

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) является одной из ключевых продовольственных и технических культур в мире и занимает ведущие позиции по площади посевов и объёму производства среди клубнеплодов [1]. В Российской Федерации картофель традиционно рассматривается как стратегически важная культура, играющая существенную роль в продовольственной безопасности, кормопроизводстве и перерабатывающей промышленности.

Одним из основных факторов, ограничивающих продуктивность и качество картофеля, являются вирусные инфекции. Вирусы картофеля вызывают широкий спектр симптомов – от лёгкой мозаики и хлорозов листьев до выраженной деформации, некрозов, карликовости растений и ухудшения качества клубней. Симптомы могут значительно варьировать в зависимости от штамма вируса, генотипа растения и условий окружающей среды, включая температуру и агротехнические условия [2]. Особую опасность представляют вирусы, передающиеся с семенным материалом, поскольку они приводят к феномену «вырождения» сорта при многолетнем вегетативном размножении: накопление вирусной нагрузки в семенных клубнях от поколения к поколению сопровождается прогрессирующим снижением урожайности и качества продукции [3].

Для картофеля описан целый комплекс вирусных патогенов, среди которых наибольшее экономическое значение имеют вирус картофеля Y (PVY), вирус картофеля X (PVX), вирус скручивания листьев картофеля (PLRV), вирус картофеля A (PVA), вирус картофеля S (PVS), вирус моп-топ картофеля (PMTV), вирус скручивания листьев картофеля (PLRV) и ряд других. Многие из них широко распространены в основных картофелеводческих регионах мира и часто встречаются в виде смешанных

инфекций, что усиливает тяжесть проявления симптомов и усугубляет потери урожая [4].

Особенностью вирусных болезней картофеля является то, что значительная часть инфекции протекает латентно или слабо выраженной симптоматикой, особенно на ранних стадиях вегетации или при благоприятных условиях выращивания. Это осложняет визуальную диагностику и способствует скрытому распространению вирусов вместе с семенным материалом. В результате без применения вирусологической диагностики (серологической, молекулярной) и систем производства оздоровленного посадочного материала поддерживать высокий фитосанитарный статус посадочного материала практически невозможно.

Передача вирусов картофеля осуществляется несколькими путями, среди которых основное значение имеют вегетативное размножение и перенос насекомыми-векторами. Наиболее важными переносчиками являются тли, которые распространяют вирусы непersistентным способом, обеспечивая быстрое заражение растений в поле. Кроме того, вирусы могут сохраняться в альтернативных хозяевах, включая сорные растения семейства паслёновых, что формирует природные резервуары инфекции и усложняет борьбу с заболеваниями [5].

Среди многочисленных вирусов картофеля вирус картофеля Y (Potato virus Y, PVY) рассматривается как один из наиболее опасных и экономически значимых патогенов, вызывающий существенное снижение урожайности (до 50–80 % в зависимости от сорта и штамма вируса), деградацию семенного материала и ухудшение товарных качеств клубней. PVY широко распространён во всех регионах возделывания картофеля и считается наиболее значимым вирусом данной культуры в мировом масштабе. Его высокая вредоносность обусловлена как эффективной передачей тлями, так и значительной генетической вариабельностью, способствующей появлению новых, более агрессивных штаммов [6].

1.2. Вирус картофеля Y и его генетическое разнообразие

Таксономическое положение и общая характеристика вируса картофеля Y

Вирус картофеля Y (Potato virus Y, PVY; далее — вирус картофеля Y, PVY) относится к семейству Potyviridae, одному из крупнейших семейств растительных вирусов, включающему около 160 видов [88]. Вирус представляет собой гибкий нитевидный вирион длиной около 680–900 нм и шириной 11–13 нм. Геном PVY — одноцепочечная РНК положительной полярности длиной примерно 9,7 тыс. нуклеотидов. На 5'-конце геномной РНК ковалентно связан вирусный белок VPg, а на 3'-конце располагается поли(А)-хвост (рис. 1) [7].

Геном PVY организован в виде одной крупной открытой рамки считывания, кодирующей полипротеин, который протеолитически расщепляется на ряд структурных и неструктурных белков. Дополнительно за счёт сдвига рамки считывания формируется белок P3N-PIPO. В совокупности геном PVY кодирует 11 белков [7].

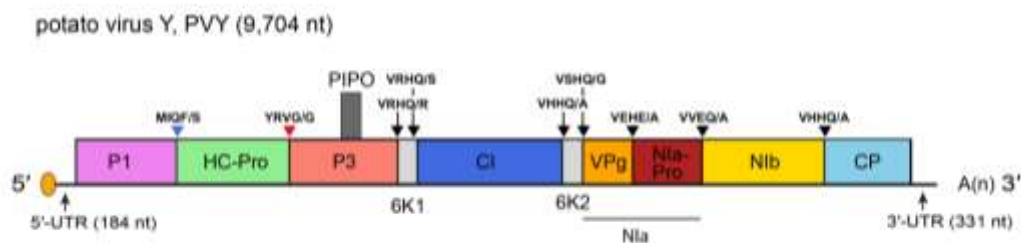


Рисунок 1. Схематическое изображение организации генома вируса Y картофеля и функции основных белков [7].

Анализ аминокислотных последовательностей показал, что продукты полипротеина Y вируса картофеля относятся к различным функциональным доменам, участвующим в протеолизе, репликации РНК, межклеточном и системном транспорте, формировании капсида и подавлении защитных механизмов растения-хозяина [8].

К белкам PVY относятся [6,9]:

- P1 (Protein 1) — первый по счёту белок, кодируемый 5'-концевым участком генома. Обладает протеазной активностью за счёт домена на С-

конце, что позволяет ему аутокаталитически отщепляться от соседнего белка HC-Pro в составе полипротеина. Показано, что P1 связывает одно- и двуцепочечную РНК, участвует в репликации вирусного генома и может влиять на устойчивость растения-хозяина, модифицируя РНК-интерференцию.

- HC-Pro (Helper Component–Proteinase) — многофункциональный белок, участвующий в непersistентной передаче вируса тлями и в межклеточном/системном транспорте в растении. HC-Pro является ключевым супрессором РНК-сайленсинга: его С-концевая часть способна связывать малые интерферирующие РНК и нарушать работу RNAi-путей защиты.

- P3 (Protien 3) и 6K1 — мембранно-ассоциированные белки, не связывающие РНК напрямую. P3 вовлечён в репликацию и распространение вируса. В результате сдвига рамки считывания в +1 в области P3 образуется белок P3N-PIPO, локализующийся в плазмодесмах и участвующий в клеточно-клеточном перемещении вируса.

- CI (Cylindrical Inclusion protein) — белок цилиндрических включений, формирующий характерные «завихрения» в цитоплазме инфицированных клеток, типичные для потивирусных инфекций.

- 6K2 — небольшой мембранный белок, критичный для репликации вируса; он якорит репликационный комплекс к эндоплазматическому ретикулуму и участвует в формировании везикул ЭПР, на поверхности которых происходит синтез вирусной РНК.

- NIa (Nuclear Inclusion a) — включает два домена: VPg и протеазный домен. Протеаза NIa разрезает большинство сайтов в полипротеине-предшественнике. VPg локализуется в зависимости от контекста: комплекс VPg–NIa обнаруживается в ядрышке, тогда как 6K2–VPg–NIa — в везикулах ЭПР (эндоплазматический ретикулум). Свободный VPg ковалентно связан с 5'-концом геномной РНК через остаток тирозина. Взаимодействие VPg с фактором трансляции eIF4E является критически важным для успешной инфекции.

- NIb (Nuclear Inclusion b) — РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp), осуществляющая синтез вирусной РНК;
- СР (капсидный белок; Coat Protein) — необходим для упаковки геномной РНК в вирионы, а также участвует в межклеточном и системном транспорте и взаимодействии с тлями-переносчиками;
- РЗН-PIPO (Pretty Interesting Potyvirus ORF) участвует в межклеточном транспорте вируса и обеспечивает перемещение вирусных частиц через плазмодесмы.

Штаммовое разнообразие вируса картофеля Y и его рекомбинантные формы

В природе PVY представлен совокупностью штаммов и генотипов, вызывающих разнообразные симптомы на листьях и клубнях картофеля. Интенсивность проявлений зависит от штамма вируса, генотипа растения-хозяина и условий среды [6].

Высокая вариабельность PVY обусловлена, во-первых, особенностями РНК-зависимой РНК-полимеразы, не обладающей «proofreading»-активностью (что характерно для большинства РНК-вирусов), а во-вторых, склонностью к рекомбинации между различными штаммами (генотипами) [10]. В результате формируется сложная мозаичная структура геномов, в которой отдельные фрагменты происходят от разных «родительских» линий.

На данный момент описаны и секвенированы геномы более 400 изолятов PVY, что позволило существенно уточнить филогенетические связи между ними и структуру рекомбинантов. Однако база данных последовательностей продолжает быстро пополняться, а система классификации штаммов и обозначений изолятов продолжает уточняться [10].

Одна из первых классификаций штаммов PVY основывалась на биологическом тестировании на дифференциальных сортах картофеля, несущих различные гены гиперчувствительного ответа (HR). Локальный HR

проявляется в виде некротических пятен в местах проникновения вируса и ограничивает его распространение [4].

В этой системе: штамм PVY^C идентифицировали по способности вызывать HR у сортов с геном *Nc* (например, ‘King Edward’); штамм PVY^O — у сортов с геном *Ny* (например, ‘Desiree’); некоторые сорта (например, ‘Maris Bard’), несущие оба гена (*Nc* и *Ny*), проявляли HR как к PVY^C, так и к PVY^O [11]. Изоляты штамма PVY^N («necrotic strain» [97]) определяли по способности обходить защиту, обусловленную генами *Ny* и *Nc* и, соответственно, не вызывать HR у сортов картофеля, несущих эти гены. Кроме того, PVY^N отличается от PVY^C и PVY^O по реакции табака: PVY^N вызывает некроз жилок, тогда как два других штамма — побеление жилок и мозаичную симптоматику. Позднее были описаны и другие штаммы, такие как PVY^Z и PVY^E [11, 12].

С развитием методов секвенирования стало ясно, что значительная часть изолятов PVY представляет собой рекомбинанты, геномы которых составлены из фрагментов штаммов PVY^O и PVY^N [12]. При этом оказалось, что один и тот же серотип может включать изоляты различных генетических групп, например, PVY^{EU-N} и PVY^{NA-N}, относящиеся к серотипу PVY^N [12].

Для ряда основных рекомбинантных групп (PVY^{NTN}, PVY^{N:Wi}, PVY^{NTN}) описаны типичные точки рекомбинации (ТР).

- Геном PVY^{N:O} имеет одну основную ТР,
- PVY^{N:Wi} — две ТР (одна совпадает по положению с ТР у PVY^{NTN}),
- PVY^{NTN} — три (NTNa) или четыре (NTNb) точки рекомбинации; при этом NTNa и NTNb имеют три общие ТР (рис. 2).

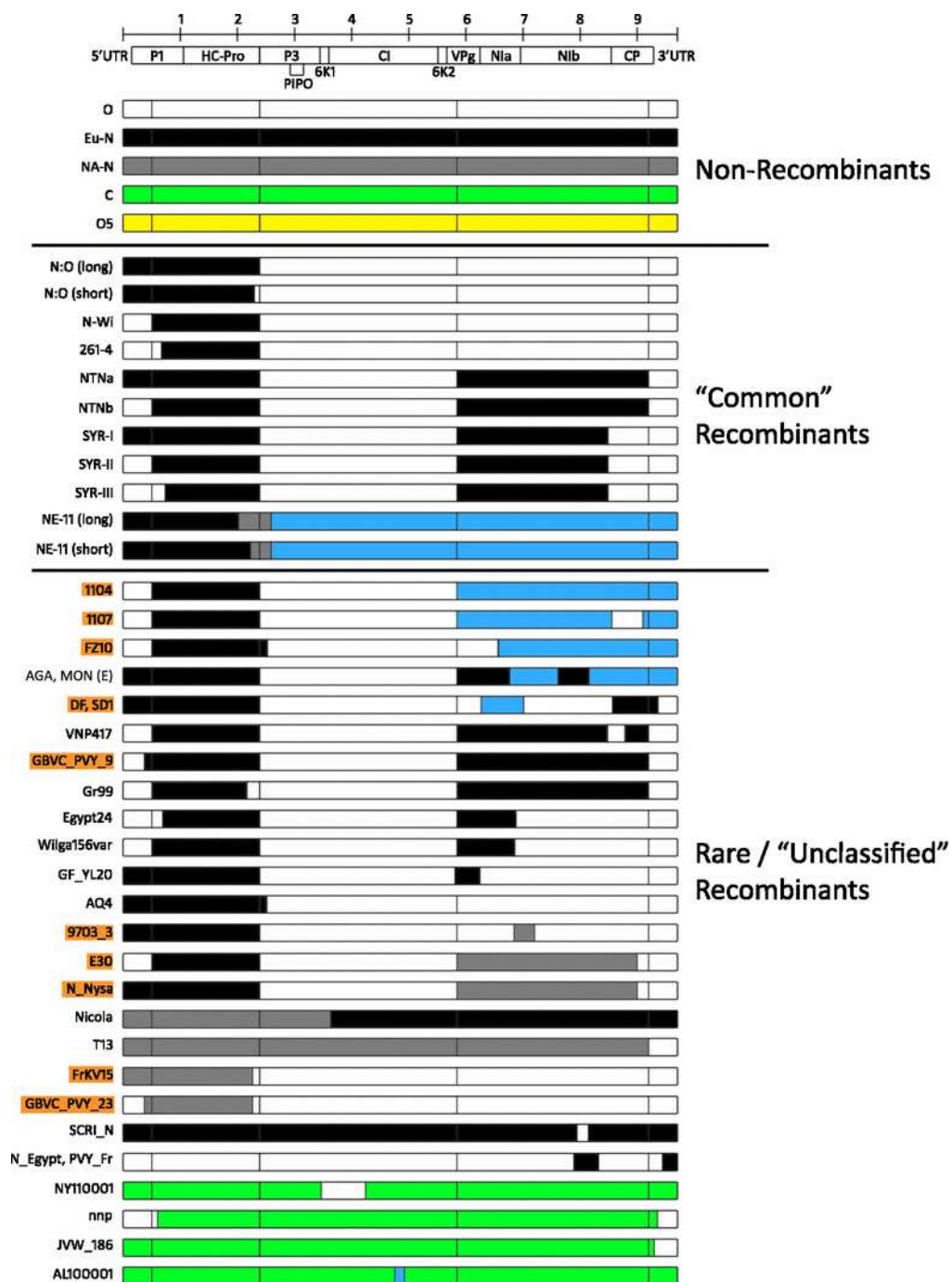


Рисунок 2. Схематическое изображение рекомбинантных структур вируса картофеля Y (PVY). Линейка сверху отображает геном PVY (около 9,7 тыс. нуклеотидов), отдельные цистроны представлены в виде прямоугольников с обозначением соответствующих белков [12].

Четыре основных точки рекомбинации относительно консервативны для большинства рекомбинантных линий, однако описаны и более редкие варианты, в которых положение TP1 и TP4 может быть смещено [6, 13].

Совокупность высокой мутационной изменчивости и рекомбинации приводит к формированию сложной популяционной структуры PVY,

включающей несколько филогенетических линий, часто коррелирующих с географическим происхождением, набором штаммоспецифических признаков и спектром поражаемых сортов.

Симптоматика и влияние PVY на растения картофеля

Клинические проявления инфекции PVY у картофеля зависят от штамма вируса, генотипа растения-хозяина, возраста растений на момент заражения и условий выращивания. Наиболее типичные симптомы включают [5, 8]:

- мозаичное и пятнистое окрашивание листьев;
- хлорозы, краевой и межжилковый некроз;
- сморщивание и деформацию листовых пластинок;
- карликовость, задержку роста побегов и разреженность кустов;
- некротические полосы на черешках и стеблях у чувствительных сортов;
- ухудшение формирования клубней (уменьшение их количества и массы) и снижение товарных качеств (деформации, поверхностные некрозы, кольцевые пятна при наличии соответствующих штаммов).

Особенно тяжёлые проявления наблюдаются при поражении некротическими и рекомбинантными штаммами PVY, а также при смешанных инфекциях с другими вирусами, такими как PVX и PLRV. Коинфекция может приводить к синергетическому усилению симптомов, резкому снижению урожайности и более быстрому вырождению семенного материала.

В экономическом отношении PVY опасен не только за счёт прямого снижения урожайности и качества клубней, но и из-за жёстких требований к фитосанитарному статусу семенного картофеля. Даже относительно низкий процент заражённых растений в исходных посевах может за несколько поколений привести к значительному росту инфицированности семенного фонда [3].

Пути передачи и эпидемиология PVY

PVY обладает широким спектром путей передачи, что во многом определяет его эпидемиологический успех. Основные пути распространения вируса [6, 8]:

- Передача вируса осуществляется тлями-переносчиками по непersistентному типу — вирус кратковременно удерживается на стилете насекомого и передается при кратковременных пробных проколах тканей растения. Более 40 видов тлей способны переносить PVY при коротком периоде питания. Вирус быстро приобретает и теряет способность передаваться, что делает борьбу с переносчиками сложной задачей: даже кратковременное питание случайных пролётных тлей может приводить к заражению;

- Передача с семенными клубнями. Инфицированные маточные растения формируют заражённые клубни, которые служат основным источником вируса для следующего поколения. При повторных посадках нездоровленных клубней происходит накопление PVY и «вырождение» сорта;

- Механическая передача. Вирус может распространяться при выполнении агротехнических операций (срезка ботвы, сортировка, уборка и т.п.), особенно при наличии повреждений тканей.

В природных условиях эпидемиология PVY определяется совокупностью факторов: численностью и видовым составом тлей, сортовым составом картофеля, степенью исходной заражённости семенного материала, а также агроклиматическими условиями. В регионах с тёплым климатом и длительным вегетационным периодом риск распространения PVY, как правило, выше, чем в зонах с коротким и прохладным летом.

Жизненный цикл PVY и взаимодействие с растением-хозяином

Внутри клетки-хозяина PVY проходит несколько перекрывающихся стадий жизненного цикла: проникновение, трансляция геномной РНК, репликация, межклеточный и системный транспорт, упаковка в вирионы и выход в новые клетки [14].

После проникновения вирусной РНК в цитоплазму она транслируется в полисомах с образованием полипротеина, который затем протеолитически расщепляется на функциональные белки [9]. На мембранах ЭПР (эндоплазматический ретикулум) формируются репликационные комплексы, где синтезируется минус-цепочечная и затем плюс-цепочечная вирусная РНК [14]. Новосинтезированные РНК служат как матрицей для дальнейшей трансляции, так и геномом для упаковки во вновь формируемые вирионы.

Через плазмодесмы при участии вирусных и клеточных белков осуществляется межклеточный транспорт, а затем — системное распространение по проводящей системе растения [6, 14]. Параллельно активируются механизмы антивирусной защиты хозяина, включая РНК-интерференцию (RNAi) и другие элементы врождённого иммунитета, приводящие к частичной деградации вирусной РНК и ограничению инфекции [15]. В ответ PVY использует свои супрессоры RNAi (прежде всего HC-Pro) и вмешивается в транскрипцию и трансляцию ряда генов хозяина, перераспределяя ресурсы клетки в пользу собственной репликации [9, 15].

Методы изучения генетического разнообразия вируса картофеля Y

Изучение генетического разнообразия PVY и структуры его популяций опирается на сочетание биологических, серологических и молекулярно-генетических методов, а также современных подходов высокопроизводительного секвенирования.

К основным подходам относятся:

1. Биологическое типирование [6]
 - использование дифференциальных сортов картофеля и индикаторных растений (картофель, табак, *Nicotiana benthamiana* и др.) для определения штаммовой принадлежности по характеру симптомов и гиперчувствительному ответу;
 - тестирование реакции растений с известными R-генами (Ny, Nc, Nz, Ry и др.).
2. Серологические методы [16]

- различные варианты ELISA (DAS-ELISA, TAS-ELISA) для выявления вируса;

- использование штаммоспецифических антител для оценки распространённости отдельных линий вируса.

3. Молекулярная диагностика и типирование [17]

- RT-PCR с универсальными праймерами к консервативным участкам генома (обычно CP, NIb, P1) для детекции PVY;

- мультиплексная и штаммоспецифическая RT-PCR для различения основных штаммов и рекомбинантных вариаций;

- анализ рестриционных профилей (RFLP) амплифицированных фрагментов генома.

4. Секвенирование и филогенетический анализ [18]

- Sanger-секвенирование отдельных геномных фрагментов (капсидный белок, P1, HC-Pro, 3'-нетранслируемая область) с последующим построением филогенетических деревьев и определением филогрупп;

- полногеномное секвенирование изолятов PVY для точного определения структуры рекомбинантов, локализации точек рекомбинации и выявления новых генетических линий;

- использование программных пакетов для анализа рекомбинации и филогенетики (RDP, SimPlot, MEGA и др.).

5. Высокопроизводительное секвенирование (NGS) [18]

- RNA-seq тотальной РНК или обогащённых фракций (вирусной РНК, малых РНК) из растений-хозяев и иногда из насекомых-векторов;

- метагеномный подход, позволяющий одновременно выявлять несколько вирусов, оценивать коинфекции и получать данные о генетическом составе популяций PVY без предварительного культивирования или клонирования;

- анализ малых вирусспецифичных РНК (small RNA-seq) как индикатор активной репликации вируса и источник информации о генетическом варианте PVY.

Высокопроизводительное секвенирование открыло возможность получать репрезентативную картину генетического разнообразия PVY в различных регионах, сортах и условиях выращивания. Такие подходы позволяют:

- выявлять редкие и смешанные варианты вируса;
- реконструировать структуру рекомбинантных геномов;
- оценивать популяционную структуру и географическую дифференциацию изолятов;
- сопоставлять генетические особенности PVY с фенотипическими проявлениями инфекции и эффективностью R-генов.

В настоящее время известно более 40 вирусов, поражающих картофель, однако коммерчески значимые потери чаще всего связаны с ограниченным набором патогенов, среди которых PVY занимает одно из ведущих мест [19]. Учитывая то, что картофель является третьей по значимости продовольственной культурой в мире и важным компонентом продовольственной безопасности, особенно в странах с развивающейся экономикой, мониторинг и анализ генетического разнообразия PVY является критически важной задачей.

Полученные таким образом сведения служат основой для разработки сортов с устойчивостью к наиболее распространённым и опасным линиям вируса, рационального дизайна вирусспецифических дцРНК и других средств защиты, формирования регионально адаптированных стратегий контроля вирусных инфекций картофеля.

1.3. Иммуниет картофеля к вирусам и роль РНК-интерференции

Типы устойчивости картофеля к вирусам

Для картофеля описано несколько типов устойчивости к вирусным инфекциям [20]:

- горизонтальная (полевая) устойчивость;
- устойчивость к накоплению вируса;

- ограничение транспорта вируса;
- вертикальная устойчивость (устойчивость зрелых растений);
- толерантность;
- устойчивость к переносчикам вирусов;
- гиперчувствительный ответ (HR) и сверхустойчивость (ER).

Горизонтальная (полевая) устойчивость проявляется в снижении доли растений, заражающихся в естественных условиях. При этом инфекция может присутствовать, но за счёт ограничения репликации вируса вегетативные органы и клубни не накапливают критических концентраций вируса, и растения сохраняют продуктивность.

Устойчивость к транспорту вируса ограничивает системное распространение вируса по проводящей системе и, в частности, его перенос в клубни, что имеет принципиальное значение для семеноводства.

Устойчивость зрелых растений характеризуется снижением восприимчивости по мере развития растения. Для PLRV, PVM, PVX и PVY показано, что на поздних стадиях вегетации репликация вируса замедляется, что дополнительно ограничивает их распространение в тканях и клубнях.

Толерантность означает, что растения инфицированы, но сохраняют нормальный рост и формируют урожай без выраженных симптомов. Толерантные сорта могут служить скрытым резервуаром вирусов и способствовать их циркуляции в агроценозах.

Устойчивость к тлям-переносчикам важна для практики, поскольку снижает вероятность первичного и вторичного заражения растений.

Ключевой компонент специфической устойчивости картофеля к вирусам — гены устойчивости (R-гены), запускающие сигнальные каскады, приводящие к гиперчувствительному ответу (HR) или сверхустойчивости (ER) [21]. Для многих экономически значимых вирусов картофеля конкретные R-гены ещё не идентифицированы, однако значительное число генов устойчивости к вирусу картофеля Y найдено в диких видах картофеля [11].

Селекционная работа основана на интрогрессии таких генов из диких форм в культивируемые сорта, благодаря чему создано множество сортов картофеля с повышенной устойчивостью к PVY. Выявлены N-гены Ny, Nc и Nz, обеспечивающие HR к соответствующим штаммам PVY: PVY^O, PVY^C и PVY^Z, а также ген Ry, ответственный за сверхустойчивость ER [21]. Ген Ny распознаёт штамм PVY^O, тогда как Nc и Nz распознают штаммы PVY^C и PVY^Z посредством взаимодействия с белком HC-Pro, но не распознают вирусный белок оболочки.

Появление новых штаммов, таких как PVY^N и рекомбинантный штамм PVY^{NTN}, привело к преодолению устойчивости, обеспечиваемой рядом R-генов [6]. Эти штаммы особенно опасны, поскольку способны обходить HR-опосредованную защиту. Показано, что у растений, несущих одновременно ген Ry (ER) и Ny (HR), при инокуляции штаммом PVY^O реализуется именно сверхустойчивость ER без развития некротических симптомов [11, 19].

Исследования генов Rx у картофеля и N у табака подтвердили, что гены, обуславливающие ER, эффективно блокируют системное распространение вируса в растении, тогда как гены HR часто обеспечивают лишь частичную защиту из-за более поздней активации ответа. В этом контексте ER рассматривается как наиболее надёжная форма устойчивости к рекомбинантным штаммам PVY, и формирование соответствующих генотипов является приоритетом для селекции.

Помимо классических R-генов, изучаются и иные генетические подходы к созданию устойчивости. Один из них основан на модификации факторов трансляции, участвующих во взаимодействии с вирусными белками. Так, получены трансгенные линии картофеля с модифицированным фактором eIF4E, несущим замену, аналогичную аллелю *pvr12* стручкового перца, обеспечивающему устойчивость к PVY [22, 23].

Таким образом, дикорастущие виды картофеля служат важным источником генов устойчивости, а их аллельное разнообразие определяет потенциал для селекции современных устойчивых сортов. Одновременно

высокая генетическая изменчивость и рекомбинация в популяциях PVY требуют постоянного обновления и комбинирования методов защиты, включая использование форм сверхустойчивости и новых молекулярных стратегий.

Общая характеристика иммунитета растений

Иммунитет растений представляет собой многоуровневую систему, включающую как предварительно сформированные барьеры, так и индуцируемые патогеном механизмы защиты. Понимание этих механизмов имеет принципиальное значение для биотехнологии и агрономии, поскольку служит основой для разработки устойчивых сортов и новых методов защиты культур.

К основным компонентам защитной системы относятся (рис.3):

- физические барьеры (кутикула, клеточная стенка);
- предварительно сформированные антимикробные соединения (фитоалексины, антимикробные пептиды, ингибиторы ферментов, детоксифицирующие ферменты);
- системы распознавания патогенов (рецепторы распознавания паттернов — PRR, и внутриклеточные рецепторы устойчивости — NLR);
- сигнальные пути, включая фитогормональные регуляторы (SA — салициловая кислота, JA — жасмоновая кислота, ET — этилен, ABA — абсцизовая кислота и др.);
- индуцируемая защита (гиперчувствительный ответ, синтез PR-белков, усиление лигнификации, накопление АФК);
- РНК-интерференция как специфический механизм распознавания и деградации вирусных нуклеиновых кислот.

Исход инфекции определяется взаимодействием трёх компонентов: патогена, растения-хозяина и факторов окружающей среды — так называемый «треугольник болезни» [24].

Иммунная система растений включает два взаимосвязанных уровня распознавания: рецепторы плазмалеммы, воспринимающие внеклеточные сигналы, и внутриклеточные рецепторы, обнаруживающие эффекторный белки патогенов [20]. Оба уровня запускают сигнальные каскады, приводящие к активации защитных реакций на месте инфекции и к формированию системной устойчивости.

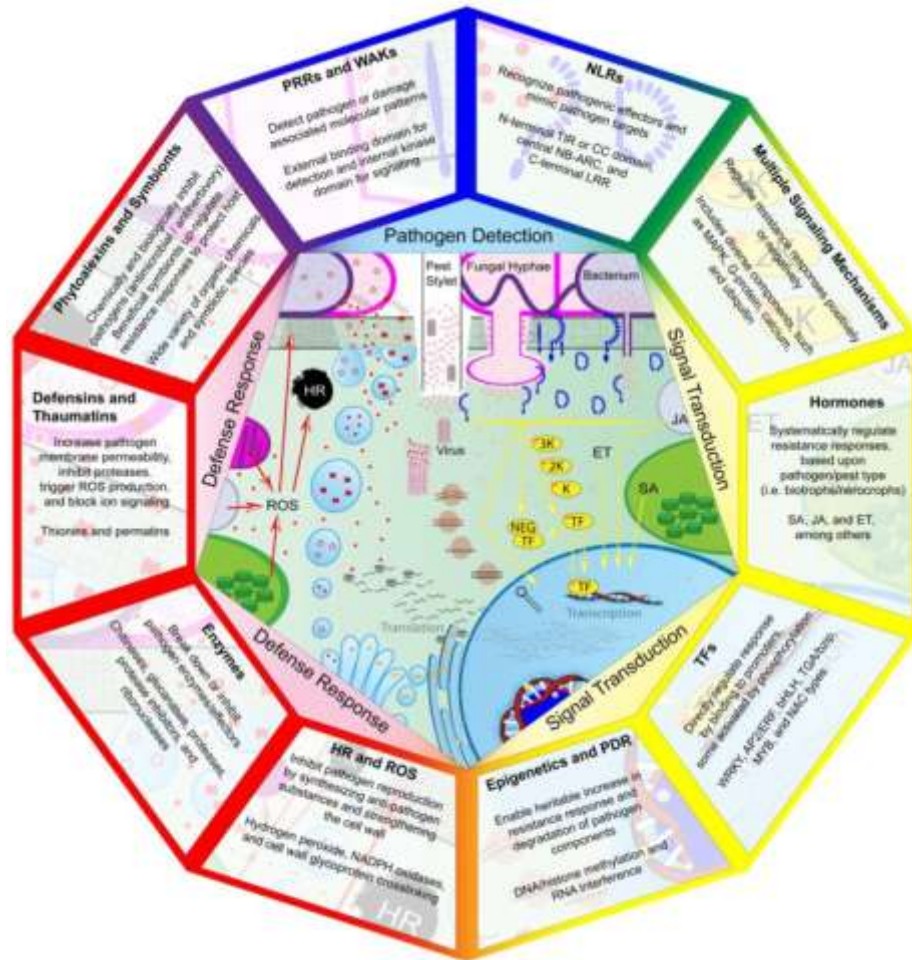


Рисунок 3. Компоненты механизмов устойчивости растений к болезням, участвующие в обнаружении патогенов, передаче сигнала и защитной реакции (обнаружение вверху в центре и движение по часовой стрелке, заканчивающееся защитной реакцией в левом верхнем углу). PRR: рецепторы распознавания образов; WAK: ассоциированные со стенками киназы; NLR: нуклеотидсвязывающие домены и богатые лейцином повторы; PDR: устойчивость, обусловленная патогенами; HR: гиперчувствительная реакция; TIR: N-концевой рецептор, подобный Toll/интерлейкину-1; CC: спирально-спиральный; SA: салициловая кислота; JA: жасмоновая кислота; ЭТ: этилен [24].

Паттерн-индуцированный иммунитет (PTI)

Вторым уровнем иммунитета является эффектор-запускаемый иммунитет (ETI) — опосредован продуктами R-генов, чаще всего внутриклеточными белками семейства NLR. Эти рецепторы обнаруживают эффекторный белок патогенов напрямую или модификации их клеточных мишеней, претерпевают конформационный переход из АДФ-связанного в активное АТФ-связанное состояние и инициируют мощный защитный ответ, часто сопровождающийся гиперчувствительной реакцией (HR) [30-32].

NLR-гены формируют быстро эволюционирующие кластеры, подверженные рекомбинации [33]; мобильные элементы вносят вклад в разнообразие их регуляторных областей. NLR-белки могут содержать интегрированные домены-«ловушки» (например, WRKY-подобные), имитирующие природные мишени эффекторов [32]. После активации NLR взаимодействуют с белками-медиаторами, такими как NDR1 и EDS1, и инициируют сигнальные каскады, приводящие к сильному локальному и системному иммунному ответу [32, 34].

Современные данные показывают, что РТІ и ЕТІ функционируют не изолированно, а взаимно усиливая друг друга (рис. 3). В двух недавних работах, опубликованных в журнале Nature [35-37], были использованы весьма элегантные методологические подходы к анализу путей РТІ и ЕТІ с использованием системы *Arabidopsis thaliana*–*Pseudomonas syringae*. Обе группы выявили взаимозависимости между двумя механизмами, включая важные выводы о том, что ЕТІ зависит от компонентов РТІ и что ЕТІ функционирует, в частности, за счет усиления РТІ (рис. 5) [37].

Разнообразие видов растений и растительных патогенов заставляет популяции растений развивать весьма разнообразный набор иммунных рецепторов и способов ответа (рис. 3).

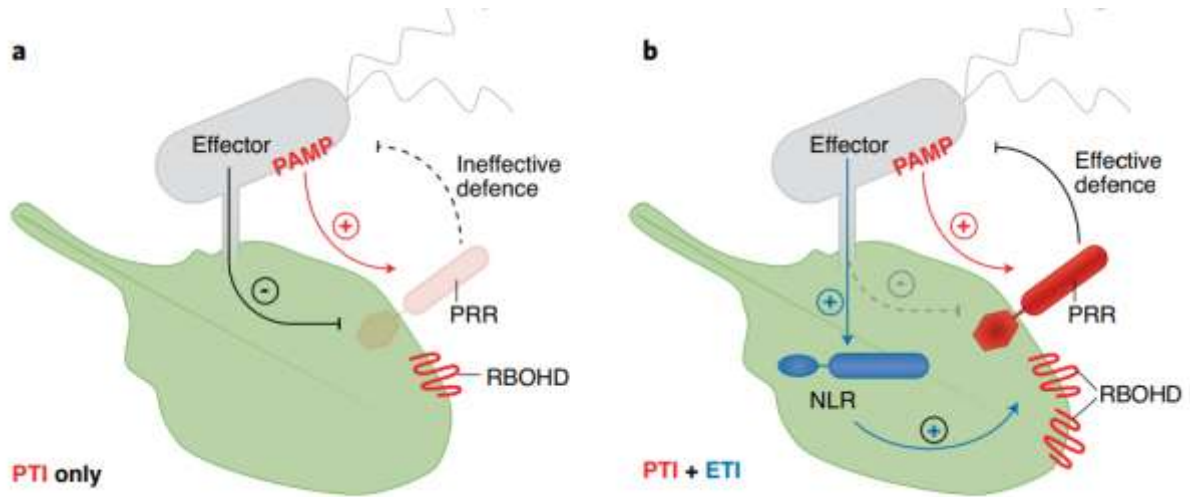


Рисунок 5. Функциональное взаимодействие РТИ и ЕТИ. а, Бактериальная инфекция запускает защитные реакции, вызванные РРР, такие как активация активности НАДФН-оксидазы (RBOHD) для борьбы с распространением патогена (РТИ, красный). Однако патогены, адаптированные к хозяину, используют эффекторы (черные) для подавления РТИ, что приводит к неэффективной защите (черная пунктирная линия). б, при наличии внутриклеточных рецепторов NLR эффекторы распознаются и активируют ЕТИ (синий). Активация NLR приводит к повышению регуляции компонентов РТИ, таких как RBOHD, тем самым обходя подавляющий эффект бактериальных эффекторов (серая пунктирная линия). Следовательно, согласованное действие ЕТИ и РТИ эффективно остановит инфекцию (черный) [37].

Роль фитогормонов и пептидных сигналов

Фитогормоны образуют ещё один уровень регуляции иммунных реакций. Наиболее важную роль в контексте взаимодействия «растение–патоген» играют:

- салициловая кислота (SA),
- жасмоновая кислота (JA),
- этилен (ET),
- а также АВА – абсцизовая кислота, NO – оксид цинка, цитокинины, гиббереллины, ауксин и брассиностероиды [34, 38].

Салициловая кислота в значительной мере ассоциирована с защитой от биотрофных патогенов и запуском системной приобретённой устойчивости. Передача сигнала от CNL- и TNL-рецепторов к SA-зависимым путям осуществляется через NDR1 и комплекс EDS1–PAD4 [30, 31]. SA активирует

транскрипционные факторы TGA через расщепление олигомерного белка NPR1 и его перенос в ядро [39].

Жасмоновая кислота и этилен, напротив, в большей степени участвуют в защите от некротрофных патогенов и травоядных насекомых, в том числе индуцируя выброс летучих соединений [34, 40]. Сигнальные пути этих гормонов также являются мишенью для эффекторов патогенов, которые могут подавлять иммунитет через вмешательство в гормональную регуляцию.

Абсцизовая кислота (ABA), NO, ауксин, цитокинины, GA и BR формируют сложную сеть перекрёстных взаимодействий между ростом и защитой: усиление иммунитета нередко сопровождается замедлением роста [34, 38]. ABA, помимо участия в реакциях на абиотический стресс, регулирует закрытие устьиц и тем самым влияет на проникновение патогенов [21, 41].

В последние годы показано, что в системной передаче стрессовых сигналов участвуют и пептидные гормоны, такие как системин, способный вызывать системный ответ на повреждение фитофагами и изменять экспрессию защитных генов в неповрежденных тканях растения и даже в соседних растениях [28, 40].

РНК-интерференция как компонент противовирусного иммунитета

РНК-интерференция (RNAi, РНКи) представляет собой один из ключевых механизмов врождённого иммунитета растений, обеспечивающий посттранскрипционное подавление экспрессии генов и играющий центральную роль в противовирусной защите [15, 42, 43].

Известно, что РНК-интерференция участвует в ответе растений на нуклеиновые кислоты, транспозоны и в регуляции экспрессии эндогенных белок-кодирующих генов. Принято считать, что идеи о РНК-интерференции зародились во время исследования Эндрю Файра и Крейга Мелло по экспрессии генов у червя *Caenorhabditis elegans* [44]. Они изучили реакцию червей на инъекции мРНК, кодирующей выработку мышечного белка, или соответствующей антисмысловой РНК и показали, отсутствие реакции. Однако совместное введение смысловой и антисмысловой РНК приводило к

изменению характера движения червей (подёргивающиеся движение). Эти результаты удивили, так как, тот же самый характер движения отмечался у червей, чьи гены, кодирующие мышечный белок, были дисфункциональными [44]. Важно сказать, что ранее появились работы, связанные с ингибированием процесса транскрипции РНК в трансгенных растениях [45]. В начале 1990-х годов при попытке изменить окраску лепестков петунии путём введения дополнительных копий гена халкон-синтазы, кодирующего ключевой фермент биосинтеза пигментов, было обнаружено неожиданное подавление экспрессии генов [46]. Предполагалось, что сверхэкспрессия данного гена приведёт к усилению окраски цветков, однако в результате формировались полностью или частично белые лепестки. При этом наблюдалось снижение экспрессии как трансгенных, так и эндогенных копий гена. Установлено, что данный эффект обусловлен посттранскрипционным подавлением экспрессии генов, получившим название ко-супрессии [47].

Для объяснения результатов, полученных на *Caenorhabditis elegans*, ученые Файр и Мелло выдвинули гипотезу о том, что двуцепочечные молекулы РНК, образованные при отжиге смысловой и антисмысловой РНК, вызывают сайленсинг экспрессии гена, соответствующего по специфичности молекуле двуцепочечной РНК. Чтобы проверить эту гипотезу, они вводили червям различные дцРНК, кодирующие определённые белки. Во всех экспериментах они обнаружили, что экспрессия генов, несущих точно такой же код, как и введённые дцРНК, была подавлена. Открытие Файра и Мелло было особенно интересным, потому что оно представляло собой первую идентификацию триггера этого явления [44].

RNAi запускается двуцепочечными РНК (дцРНК), которые могут быть:

- продуктами репликации РНК-содержащих вирусов;
- транскриптами вирусной ДНК в случае ДНК-вирусов;
- искусственно введёнными дцРНК (трансгенными или экзогенными).

Dicer-подобные белки (DCL) расщепляют дцРНК на малые фрагменты — малые интерферирующие РНК, которые затем включаются в комплекс

RISC с участием белков семейства Argonaute (AGO). Комплекс RISC направляет специфическое расщепление комплементарных вирусных РНК или подавление их трансляции [48, 49].

В растениях сигнал RNAi способен перемещаться на короткие расстояния (через плазмодесмы) и системно по флоэме, благодаря чему формируется системная антивирусная защита [50]. Вирусы, в свою очередь, продуцируют супрессоры RNAi (VSR), которые вмешиваются в биогенез или функцию малых интерферирующих РНК и других малых РНК [15, 48, 51].

Экзогенно введённая вирусспецифическая дцРНК, с одной стороны, служит триггером RNAi, а с другой — может распознаваться рецепторами паттерн-индуцированного иммунитета как молекулярный паттерн вирусного происхождения, активируя PTI [41, 52]. Это обосновывает концепцию двойной роли дцРНК как сигнала RNAi и PTI в противовирусном ответе растений.

Малые интерферирующие РНК

Малые интерферирующие РНК — один из основных классов малых некодирующих РНК, непосредственно участвующих в противовирусном иммунитете растений [15, 42, 50].

У РНК-вирусов образование миРНК начинается с расщепления вирусных дцРНК DCL-белками с образованием фрагментов длиной 21–24 нуклеотида. Одна из цепей (guide strand) включается в комплекс RISC с белками AGO и обеспечивает специфическое распознавание и расщепление вирусной РНК. Остаточные фрагменты могут служить матрицей для РНК-зависимых РНК-полимераз (RdRp), что приводит к образованию вторичных миРНК и усилению сигнала сайленсинга. Метилирование миРНК белком HEN1 повышает их стабильность и эффективность [42, 49, 53].

У ДНК-вирусов двуцепочечные РНК-предшественники миРНК образуются в результате двунаправленной транскрипции генома вируса РНК-полимеразой II и гибридизации комплементарных транскриптов [15, 54].

Многие вирусы развили механизмы уклонения от миРНК-опосредованного ответа, включая продукцию супрессоров RNAi (VSR) или формирование структур РНК, плохо распознаваемых растительными DCL-белками [48, 51].

Накопление знаний о биогенезе и механизмах действия миРНК способствовало разработке РНК-основанных технологий защиты растений, включая трансгенные конструкции и экзогенное внесение вирусспецифической дцРНК, эффективность которых активно активно исследуется для различных сельскохозяйственных культур [55, 56].

МикроРНК

МикроРНК и миРНК близки по размеру, структуре и использованию общего аппарата DCL/AGO, но отличаются по происхождению и ряду функций. Они являются малыми РНК эндогенного происхождения, кодируемые специализированными MIR-генами. Их биогенез включает [49, 57]:

1. транскрипцию первичного транскрипта (pri-miRNA), содержащего шпилечную структуру;
2. процессинг микропроцессорным комплексом DCL1–HYL1 с образованием предшественника pre-miRNA;
3. последующее расщепление с формированием дуплекса miRNA/miRNA*;
4. метилирование HEN1 и включение зрелой миРНК в комплекс RISC.

Большинство растительных миРНК имеют высокую комплементарность к своим мишеням, что обеспечивает преимущественно расщепление мРНК, хотя возможны и эффекты подавления трансляции [49].

МикроРНК участвуют в регуляции широкого круга процессов — от роста и развития до ответов на биотический и абиотический стресс [57]. В контексте вирусных инфекций миРНК: могут изменять уровень экспрессии генов, влияющих на развитие симптомов, регулировать компоненты

иммунной системы (AGO, RdRp и др.) и опосредовать перекрёстные взаимодействия с гормональными путями и АФК [58-61].

Показано, что некоторые вирусы способны модифицировать уровень определённых миРНК, усиливая или ослабляя симптомы. Например, штамм вируса мозаики огурца CMV-Fny подавляет miR159, что приводит к повышению экспрессии транскрипционных факторов MYB33/MYB65 и изменению гиббереллинового сигнального пути [62].

Показано, что вирусспецифические малые РНК могут нацеливаться не только на вирусные, но и на гены растения-хозяина, вовлечённые во взаимодействие с вирусом. Так, при инфекции PVY выявлены малые РНК, потенциально комплементарные транскриптам растений, включая гены, связанные с регуляцией роста и стрессовых ответов [58].

Особый интерес представляет регуляция компонентов RNAi самими miRNA: так, miR168 нацелена на AGO1, а белок-«приманка» AGO18 связывает miR168 и тем самым защищает AGO1 от деградации [59, 63]. Подобные контуры регуляции формируют тонкий баланс между эффективностью противовирусной защиты и риском аутоиммунных реакций.

Другие малые некодирующие РНК

К другим классам малых некодирующих РНК относятся кольцевые РНК (circRNA) [64] и транс-активирующие малые интерферирующие РНК (tasiRNA) [65].

Малые некодирующие кольцевые РНК представляют собой стабильные кольцевые молекулы, образующиеся в результате обратного сплайсинга. Они обладают сайтами связывания miRNA и могут выступать в роли «губок», модифицируя доступность миРНК к их мишеням. Показано участие circRNA в регуляции роста, развития и стрессовых реакций растений [64, 66].

TasiRNA (trans-acting siRNA) образуются из некодирующих транскриптов TAS-генов в результате расщепления miRNA-зависимым путём и последующего преобразования в двуцепочечную РНК и 21-нуклеотидные фрагменты. Важнейший пример — путь TAS3, контролирующей уровень

транскрипционных факторов ARF и, следовательно, ауксин-зависимые процессы: переход от ювенильных к взрослым листьям, полярность листа и формирование боковых корней [65]. Хотя они изучены прежде всего в контексте развития, их участие в регуляции стрессовых и, возможно, иммунных реакций растений делает их перспективным объектом дальнейших исследований.

До недавнего времени паттерн-индуцированный иммунитет (PTI) практически не рассматривался как компонент противовирусной защиты растений, и считалось, что основную роль играют РНК-интерференция и иммунитет, опосредованный R-генами. Однако в последние годы показано, что PTI также участвует в противовирусном ответе. Установлено, что вирусные нуклеиновые кислоты, в частности двуцепочечная РНК, могут функционировать как PAMP и распознаваться рецепторами врождённого иммунитета растений, активируя сигнальные каскады PTI. Идентифицирован ряд (ко)рецепторных киназ и сигнальных компонентов, вовлечённых в восприятие вирусных паттернов и передачу защитных сигналов. Эти данные свидетельствуют о формировании новой парадигмы противовирусного иммунитета растений, в которой PTI функционирует совместно с RNAi и эффектор-запускаемым иммунитетом. Дальнейшие исследования природы вирусных PAMP, механизмов их распознавания и перекрёстного взаимодействия PTI с другими защитными путями будут способствовать разработке новых стратегий контроля вирусных инфекций, включая использование экзогенных молекул дцРНК и создание устойчивых сортов растений [52, 67].

В совокупности представленные данные свидетельствуют о том, что иммунитет растений к вирусам реализуется через сложную интеграцию классических иммунных путей (PTI/ETI), гормональной регуляции и механизмов РНК-интерференции [37, 68]. Экзогенно внесённая вирусспецифическая двуцепочечная РНК вписывается в эту систему как молекула, способная одновременно активировать RNAi и выступать в роли

паттерна, индуцирующего РТИ, что имеет принципиальное значение для понимания механизмов её защитного действия и лежит в основе задач настоящего исследования (рис. 6).

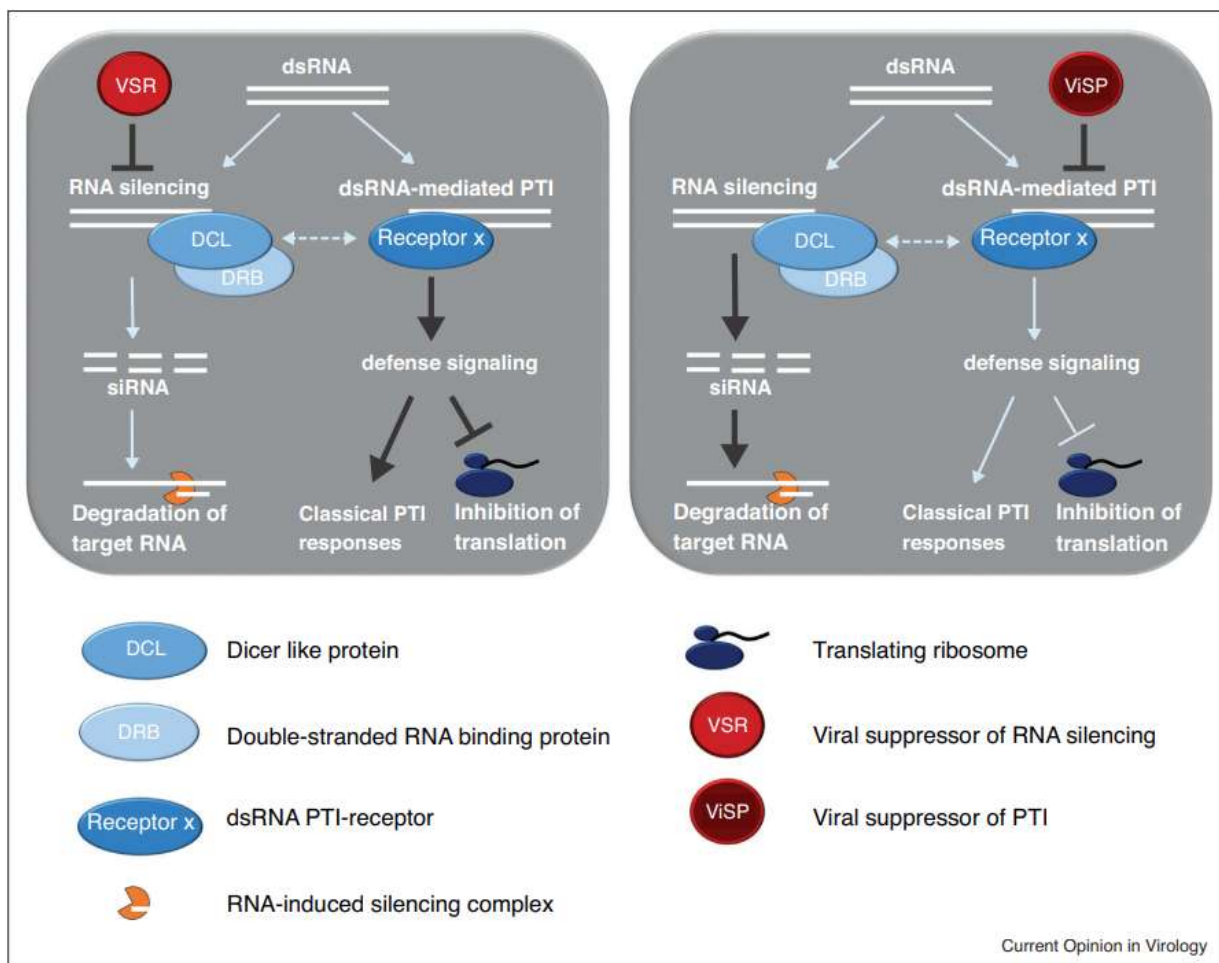


Рисунок 6. дцРНК-опосредованные противовирусные защитные механизмы и последствия функций VSR и ViSP [52].

1.4. Экзогенное применение дцРНК и малые РНК в противовирусном ответе растений

РНК-основанные технологии представляют собой эффективный инструмент управления защитными реакциями растений. В области устойчивости к вирусным заболеваниям подходы, основанные на РНК-интерференции (RNAi), широко используются в форме трансген-индуцированного сайленсинга для подавления репликации вирусных РНК или

инактивации генов восприимчивости растений-хозяев к вирусам у различных сельскохозяйственных культур [55].

Помимо трансгенных стратегий, активно развиваются экзогенные методы применения РНК, основанные на использовании двуцепочечных РНК (дцРНК), малых интерферирующих РНК и шпилечных РНК (hpRNA) для направленного подавления вирусной РНК. Такие подходы рассматриваются как более гибкая и социально приемлемая альтернатива классическим трансгенным технологиям, поскольку не требуют устойчивой модификации генома растения и позволяют осуществлять временную индукцию защитных реакций [68, 69].

Параллельно с развитием РНК-основанных подходов в вирусологии растений была адаптирована технология редактирования генома CRISPR–Cas. Изначально система CRISPR–Cas представляет собой адаптивный механизм иммунной защиты прокариот, направленный на распознавание и деградацию чужеродных нуклеиновых кислот, таких как плазмиды и фаговая ДНК. Впоследствии она была перепрофилирована как универсальный инструмент редактирования генома эукариот и нашла широкое применение в биотехнологии растений, включая разработку устойчивости к вирусным инфекциям [70-72].

Классическая система редактирования CRISPR–Cas включает два ключевых компонента: эндонуклеазу Cas, осуществляющую сайт-специфическое расщепление нуклеиновой кислоты, и одноцепочечную направляющую РНК (sgRNA), которая определяет специфичность узнавания целевой последовательности за счёт комплементарного связывания [70].

sgRNA содержит участок длиной около 20 нуклеотидов, комплементарный целевой последовательности и консервативный каркас для связывания с белком Cas. Комплекс sgRNA–Cas распознаёт целевой участок, формирует двуцепочечный разрыв ДНК, а затем клеточные системы репарации восстанавливают этот участок, что сопровождается вставками или делециями (indel) в рамке считывания и часто приводит к нокауту гена.

Эндонуклеазы Cas, нацеленные на РНК (например, Cas13), также описаны [70, 73] и используются для создания устойчивости растений к вирусам либо путем прямого воздействия на вирусные геномы (ДНК или РНК), либо через инактивацию генов растения-хозяина, необходимых для развития инфекции [71, 72].

Индукцированное хозяином подавление генов (HIGS)

Одним из первых примеров использования РНК-подходов была работа Пауэлла Абея и соавторов (1986 г.), показавшая, что трансгенные растения табака, экспрессирующие белок оболочки вируса табачной мозаики (ВТМ, TMV), демонстрируют повышенную устойчивость к заражению [74]. Позднее аналогичный подход был успешно применён и к другим растительным вирусам.

Однако последующие исследования показали, что во многих случаях основой такой устойчивости является не сам накопившийся вирусный белок, а РНК-сайленсинг, индуцированный транскриптами вирусных генов [75, 76]. Защита, основанная на РНК, считается более предпочтительной, поскольку не требует накопления чужеродных белков и может быть более специфичной и экологически безопасной.

В связи с этим фокус исследований сместился в сторону RNAi-опосредованных подходов, включая индуцированное хозяином подавление генов (HIGS). Трансгенная экспрессия предшественников малых интерферирующих РНК, в том числе шпилечных РНК (hpRNA) и двуцепочечных РНК (дцРНК), обеспечивает направленное подавление вирусных генов и формирование устойчивости растений. Такие подходы продемонстрировали высокую эффективность в отношении широкого спектра вирусов и широко используются в экспериментальных моделях [55, 77].

Вместе с тем у HIGS есть ряд ограничений:

- длительность и высокая стоимость разработки трансгенных линий;
- регуляторные ограничения, связанные с использованием ГМО;

- ограниченная приемлемость трансгенных культур в обществе.

Эти факторы стимулировали поиск нетрансгенных альтернатив, основанных на экзогенном применении дцРНК.

Сайленсинг генов, индуцированный экзогенной двуцепочечной РНК (дцРНК) – SIGS

Для преодоления ограничений трансгенных технологий был предложен подход, известный как SIGS (Spray-Induced Gene Silencing) — сайленсинг генов, индуцированный опрыскиванием [68]. В его основе лежит экзогенное нанесение дцРНК, комплементарной последовательности вирусной РНК или гена растения-хозяина.

Противовирусная защита при SIGS достигается за счет опрыскивания растений растворами дцРНК, механической инокуляции дцРНК или нанесения дцРНК под повышенным давлением.

Экзогенные дцРНК уже успешно применены для контроля более чем 10 экономически значимых вирусных заболеваний у разных видов растений (см. табл. 1). Эффективность таких технологий во многом зависит от выбора целевого участка вирусного генома: консервативные участки обеспечивают устойчивость к нескольким штаммам и уникальные участки позволяют минимизировать off-target-эффекты.

Следовательно, дизайн дцРНК и выбор целевой последовательности являются ключевыми этапами при разработке SIGS-препаратов (см. табл. 1).

Важно, что устойчивость к вирусам, индуцируемая экзогенной дцРНК, может усиливаться за счет паттерн-индуцированного иммунитета (PTI). Недавние работы показали, что дцРНК, обладающая признаками вирусного происхождения, может выступать PAMP-подобным сигналом и активировать PTI, что дополнительно ограничивает развитие вирусной инфекции [52, 67]. Таким образом, экзогенная дцРНК сочетает RNAi-опосредованную деградацию вирусной РНК и активацию врождённого иммунитета, что делает её крайне перспективным инструментом в защите растений.

Важным фактором практической реализации технологии SIGS является возможность массового производства дцРНК. Созданы технологические платформы, позволяющие получать килограммовые количества дцРНК при себестоимости порядка 0,5–1 доллара за грамм, что существенно повышает шансы на коммерциализацию [78-80]. Однако остаются и серьёзные препятствия, включая низкую стабильность «голой» дцРНК в окружающей среде и ограниченную проницаемость для растительных клеток [81]. Разработка новых методов стабилизации и доставки (капсулирование, ассоциация с наноматериалами, полимерными носителями и т.п.) является критически важным направлением для дальнейшего развития SIGS.

Таблица 1. Примеры применения экзогенных двуцепочечных РНК (дцРНК) для повышения устойчивости растений к вирусам.

Вирус/вириоид	Метод получения	Метод доставки	Растение	Литературный источник
РММoV, TMV, PPV	Экспрессируемые бактериями дцРНК	Механическая инокуляция/спрей	<i>N. benthamiana</i>	[82]
PSTVd, CEVd, CChMVd	<i>In vitro</i> синтез дцРНК	Механическая инокуляция	<i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Gynura aurantiaca</i> , <i>Dendranthema grandiflora</i>	[83]
PVY	Экспрессируемые бактериями шпичичные РНК	Механическая инокуляция	<i>N. tabacum</i>	[84]
TMV	<i>In vitro</i> синтез дцРНК	Механическая инокуляция	<i>N. tabacum</i>	[85]
ToLCNDV	<i>In vitro</i> синтез дцРНК	Опрыскивание	<i>Cucurbita pepo</i>	[86]
BtMV	Экспрессируемые бактериями дцРНК	Опрыскивание	<i>N. benthamiana</i> и <i>Beta vulgaris</i>	[87]
CGMMV	<i>In vitro</i> синтез IR-специфичной дцРНК	Опрыскивание	<i>Citrullus lanatus</i>	[88]
PaLCuV	<i>In vitro</i> синтез дцРНК	Опрыскивание	<i>N. benthamiana</i> и <i>Carica papaya</i>	[89]

Целевые гены хозяина для SIGS

Есть и другой подход к созданию устойчивости к вирусам с помощью механизма SIGS. Он заключается в подавлении генов восприимчивости у

растения-хозяина. К числу хорошо охарактеризованных генов, необходимых для успешного развития вирусной инфекции, относятся гены, кодирующие факторы инициации трансляции eIF4E, eIF(iso)4E и eIF4G [90]. Показано, что инактивация отдельных изоформ этих факторов может приводить к устойчивости к ряду вирусов без выраженного ущерба для жизнедеятельности растения.

К генам восприимчивости также относят, например, ген коилин, кодирующий белок субъядерных телец Кахаля, участие которого показано в развитии некоторых вирусных инфекций [91, 92].

Экзогенная дцРНК, специфичная к транскриптам таких генов, может наноситься на растения без генетической трансформации. Поскольку многие гены восприимчивости высоко консервативны между сортами и видами, одна и та же дцРНК может быть применима к широкому набору генотипов. Главным ограничением остаётся малое число надёжно идентифицированных и универсальных генов-мишеней. Расширение списка таких генов (в том числе среди некодирующих РНК) является важным условием дальнейшего развития SIGS.

РНК-подходы нового поколения для SIGS

Изначально в рамках SIGS в качестве триггера сайленсинга использовали преимущественно экзогенную двуцепочечную РНК (дцРНК). В дальнейшем спектр РНК-триггеров был расширен за счет искусственных микроРНК (amiRNA) и искусственных транс-активирующих малых интерферирующих РНК (atasiRNA) [93].

Одним из ограничений классического применения двуцепочечной РНК является то, что пул малых интерферирующих РНК, образующихся при её процессинге в рамках SIGS, не является предопределённым. Для эффективной загрузки в белки семейства Argonaute (AGO) миРНК должны обладать определёнными последовательностными и структурными характеристиками, включая термодинамическую асимметрию и специфические нуклеотиды на 5'-конце. В результате лишь часть фрагментов, образующихся из дцРНК,

оказывается функционально активной, что может снижать эффективность сайленсинга [63].

В случае искусственных микроРНК (amiRNA) зрелые последовательности miRNA целенаправленно встраиваются в структуру предшественника микроРНК (pri-miRNA) вместо природных последовательностей. Образующиеся 21-нуклеотидные молекулы подбираются таким образом, чтобы: быть высоко комплементарными вирусной мишени и обладать структурно-функциональными характеристиками, оптимальными для эффективной загрузки в белки семейства Argonaute (AGO) и формирования активного комплекса RISC [94].

После попадания соответствующей РНК-конструкции в клетку активируется эндогенный путь биогенеза miRNA, что обеспечивает формирование точного и предсказуемого набора малых РНК с заданной специфичностью. Эффективность такого подхода продемонстрирована для ряда фитопатогенных вирусов, включая вирус полосатости риса (RSV), для которого показано, что трансгенные растения, экспрессирующие искусственные микроРНК, обладают высокой устойчивостью к инфекции [95].

Недостатком одноцепочечных РНК, включая искусственные микроРНК, при экзогенном применении является их высокая чувствительность к нуклеазам окружающей среды по сравнению с двуцепочечной РНК. В связи с этим для повышения стабильности и эффективности RNAi-подходов рассматриваются различные стратегии, включая использование структурированных РНК и систем, обеспечивающих образование двуцепочечных предшественников. В частности, искусственные tasiRNA (ata-siRNA), образующиеся из TAS-транскриптов, формируют дцРНК-промежуточные структуры и обеспечивают более контролируемую генерацию малых РНК, однако их применение в основном связано с трансгенными системами [94, 96].

Возможности использования atasiRNA продемонстрированы, в частности, в работах Carbonell и соавторов [94, 96], где atasiRNA, нацеленные на вирус пятнистого увядания томатов (TSWV), обеспечивали устойчивость трансгенных томатов. Перспективным направлением является мультиплексирование — создание конструкций, содержащих несколько фрагментов, нацеленных на разные участки одного или нескольких вирусов, что может существенно повысить устойчивость и уменьшить риск появления устойчивых вариантов вируса.

Система CRISPR-Cas под контролем РНК: возможности и ограничения

Технология CRISPR–Cas сформировала обширный набор инструментов для создания противовирусной устойчивости у сельскохозяйственных культур. В целом можно выделить два основных подхода:

1. Прямое воздействие на вирусный геном (ДНК или РНК) и подавление репликации вируса.
2. Редактирование генов восприимчивости растения-хозяина с целью их инактивации.

Большинство ранних исследований проводилось с использованием ДНК-направляемой эндонуклеазы Cas9 [88]. В случае ДНК-содержащих вирусов (например, геминивирусов) трансгенная экспрессия Cas9 и специфичных sgRNA позволила нацеленно разрезать вирусный геном и тем самым существенно снижать уровень инфекции [71, 73].

Открытие РНК-направляемых эндонуклеаз, таких как FnCas9 и Cas13, расширило возможности CRISPR-подходов и для РНК-содержащих вирусов. Были созданы трансгенные растения, экспрессирующие соответствующую Cas-белок и направляющие РНК, что обеспечивало подавление вирусной репликации или транскрипции.

Ключевое ограничение CRISPR-технологий заключается в том, что компоненты системы (Cas и sgRNA) должны постоянно присутствовать в растении, что в настоящее время достижимо преимущественно через

трансгенную экспрессию. Это делает такие растения объектом регулирования как ГМО и затрудняет их широкое внедрение.

Для снижения «ГМО-нагрузки» предложены стратегии, при которых CRISPR–Cas используется транзиторно для создания мутаций в генах восприимчивости растения-хозяина. В таких системах трансгены Cas и sgRNA впоследствии могут быть элиминированы при половом размножении, либо компоненты системы доставляются в клетки в виде матричной РНК или рибонуклеопротеидных комплексов (RNP). Однако подобные подходы остаются технически сложными и особенно трудно реализуемыми для культур, размножаемых вегетативно, таких как картофель [70, 71].

Кроме того, перечень надёжно охарактеризованных генов-мишеней хозяина, влияющих на восприимчивость к вирусам, пока ограничен. Это сдерживает масштабное применение CRISPR–Cas именно в контексте противовирусной защиты.

Сравнение RNAi и CRISPR–Cas в создании вирусоустойчивости растений

RNAi-подходы (HIGS, SIGS) и CRISPR–Cas показали высокую эффективность как инструменты создания вирусоустойчивых растений. При этом CRISPR–Cas (в трансгенном варианте) ведёт к постоянным, наследуемым изменениям в генах растения. Это может быть желательным при нокауте генов восприимчивости, но порой рискованным, если такие гены выполняют важные функции в нормальном развитии, а RNAi (включая экзогенную дцРНК) вызывает преимущественно временное подавление экспрессии генов или вирусных РНК, без изменения генома. Это особенно важно, когда полная и постоянная инактивация генов может быть нежелательной или опасной, а также в случаях, когда регуляторные ограничения на ГМО затрудняют использование трансгенных растений.

Развитие технологий экзогенного применения дцРНК и других РНК-триггеров SIGS позволяет рассматривать RNAi-подходы как перспективную и более гибкую альтернативу для практического сельского хозяйства, особенно

для культур, подобных картофелю, где вегетативное размножение усложняет использование классических трансгенных стратегий.

2. Материалы и методы

Лабораторный растительный материал

В качестве модельного объекта для лабораторных экспериментов использовали растения картофеля (*Solanum tuberosum* L., сорт Индиго). Растительный материал был получен из рассады, размноженной методом микроразмножения и поддерживаемой в культуре стеблевых узлов *in vitro*. Посадочный материал предоставлен из коллекции ООО «Дока-Генные Технологии» (Рогачёво, Россия).

Через 2 недели после сегментации узлов растения переносили из условий *in vitro* в универсальный грунт (пластиковые горшки объёмом 1 л) для постепенной адаптации. В течение всего периода выращивания и проведения эксперимента растения содержали в климатической камере (Pol-Еко-Аparatura, Водзислав-Слёнски, Польша) при 16-часовом фотопериоде, температуре $22 \pm 1,0^\circ\text{C}$, относительной влажности воздуха 40–50% и с плотностью потока света $250 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Полив осуществляли по мере подсыхания субстрата; за несколько суток до закладки опыта полив не проводили.

Через 2–3 недели адаптации и роста, при достижении растениями фазы 4–5 настоящих листьев, их обрабатывали препаратами двуцепочечной РНК или соответствующим буфером. Обработку проводили путём нанесения 100 мкл раствора дцРНК, содержащего 40 мкг дцРНК на лист, на три листа каждого растения. Спустя 24 ч растения инокулировали инокулумом вируса картофеля Y либо буфером (контроль), после чего продолжали выращивать в тех же условиях климатической камеры.

Отбор листового материала проводили в несколько сроков: на 7-е сутки после инокуляции (days post inoculation, dpi/дпи) — для инокулированных и системных листьев, а на 14-е дпи — для системно заражённых верхних листьев. Для выделения РНК использовали навеску листьев массой 0,5 г.

Каждый вариант опыта включал четыре биологических повтора. Дизайн лабораторных экспериментов включал две схемы постановок, отличающиеся

комбинацией вирусной инфекции, обработки двуцепочечной РНК (дцРНК_{pvu}) и типом анализируемых листьев (обработанные, инокулированные или системно инфицированные).

Экспериментальная схема №1 включала следующие варианты:

1. обработка дцРНК_{pvu};
2. инфекция PVY;
3. инфекция PVY с последующей обработкой дцРНК_{pvu};
4. инфекция PVY с последующей обработкой дцРНК_{pvs} (неспецифическая дцРНК соответствующая нуклеотидной последовательности PVS);
5. обработка дцРНК_{pvs};
6. контроль (mock-обработка).

Экспериментальная схема №2 состояла из таких вариантов, как:

1. инфекция PVY;
2. инфекция PVX;
3. обработка дцРНК_{pvu};
4. обработка дцРНК_{pvs};
5. инфекция PVY с последующей обработкой дцРНК_{pvu};
6. инфекция PVX с последующей обработкой дцРНК_{pvu};
7. инфекция PVY с последующей обработкой дцРНК_{pvs};
8. контроль (mock-обработка).

Дополнительно была проведена оценка влияния новых дцРНК-конструкций, направленных против генов HC-Pro и P3 PVY, на накопление вируса в растениях картофеля. Для эксперимента использовали растения, инфицированные штаммом PVY^{NTN}, использованным ранее в экспериментальной схеме №1. Обработку растений проводили путём нанесения 100 мкл раствора дцРНК, содержащего 10, 50 или 120 мкг дцРНК, на листья растений.

Полевой растительный материал

Отбор листовых образцов и сбор клубней проводили на сельскохозяйственных полях коммерческого назначения в 2021–2024 гг. в различных регионах Российской Федерации. Образцы 15 сортов картофеля, различающихся по степени восприимчивости к вирусным инфекциям, были отобраны в 19 регионах РФ: Северо-Западный федеральный округ (ФО) — Псковская и Новгородская области; Центральный ФО — Московская, Брянская, Орловская, Тверская, Костромская, Ярославская, Владимирская, Тамбовская области; Приволжский ФО — Нижегородская, Пензенская области и Республика Татарстан; Северо-Кавказский ФО — Ставропольский край; Южный ФО — Астраханская область и Краснодарский край; Уральский ФО — Свердловская и Тюменская области; Дальневосточный ФО — Камчатский край.

Семенной материал получен из растений, выращенных в специализированном центре с использованием технологии *in vitro* в тепличных условиях с контролируемой средой и минимизацией риска заражения картофельными вирусами (ООО «Дока-Генные технологии», Рогачёво, Московская область, Россия). Отсутствие вирусов, в том числе вируса картофеля Y, в ростках семенного картофеля подтверждали методом ОТ-ПЦР.

Ежегодно в течение периода исследований для каждого сорта картофеля высаживали по 50–60 семенных клубней на полях указанных регионов. Через 1–2 месяца после посадки клубней проводили отбор листьев, а спустя 3–4 месяца — сбор клубней. Собранные клубни хранили при температуре +4 °С, после чего у них вырезали верхушечные почки. Полученные всходы выращивали в теплице, свободной от насекомых, при температуре 21–22 °С; образцы для дальнейшего анализа отбирали на стадии 5–8 настоящих листьев, через 3–4 недели после начала выращивания.

*Экстракция вируса и заражение растений *S. tuberosum* вирусами*

Для проведения опытов по заражению растений картофеля использовали вирус PVY (штаммы NTN и O) и PVX (российский штамм, PVX-

RU). Вирус PVY^O и PVX сохранялся в лиофилизированных листьях табака (*Nicotiana tabacum*, *Nicotiana bentamiana*) при 4°C. Предварительно вирусом заражали свежий растительный материал (*N. bentamiana*), листья которого по мере накопления вируса и проявления ярких симптомов инфекции использовали в качестве основы вирусного экстракта для инокуляции растений картофеля. PVY^{NTN} размножали на растениях картофеля (*Solanum tuberosum* L.; сорт Manhattan). Вирус картофеля S – на сорте картофеля G265.

Для получения вирусного экстракта листья табака и картофеля растирали в жидком азоте до состояния тонкой пудры, используя ступку с пестиком. Далее в растёртую массу, не допуская её нагрева, добавляли холодный калий-фосфатный/КР-буфер (0,131М K₂HPO₄, 0,01М KH₂PO₄, pH 7.5) в соотношении 1:3 (вес:объём) и растирали в нём растительную массу. Полученный гомогенат центрифугировали в течение 10 минут при 4°C на 16 000 g на центрифуге с охлаждением (Eppendorf 5418R, Германия), после чего отбирали супернатант, содержащий вирус. Супернатант использовали в качестве инокулята в течение часа после получения, сохраняя его во льду.

Для заражения листья картофеля (2-3 нижних листа) припудривали абразивным порошком (целлитом), после чего наносили по 50-100 мкл инокулята и аккуратно распределяли каплю по поверхности листа. Контрольные здоровые растения обрабатывали целлитом и КР-буфером – тоск-инокуляция.

Выделение тотальной РНК из растений

Навеску листьев картофеля без средней жилки весом в 0,5 г растирали в жидком азоте с помощью ступки и пестика. Растёртую массу переносили в 15 мл охлаждённые пробирки и добавляли тризол (InvitrogenTM TRIzolTM Reagent, ThermoFisher ScientificTM, USA) из расчёта 1 мл на 0,1 г ткани. Смесь хорошо перемешивали на вортексе и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Полученный лизат центрифугировали в течение 5 минут на 12 000g при 4°C. Супернатант переносили в новые пробирки, к нему добавляли хлороформ из расчёта 200 мкл на каждый 1 мл тризола и 2-3 минуты аккуратно

перемешивали суспензию при комнатной температуре, не используя вортекс. Далее образцы снова центрифугировали в течение 15 минут на 12 000g при 4°C. Верхнюю фазу аккуратно переносили равными объёмами в новые пробирки меньшего размера (1,5-2 мл) с низкой сорбцией (Low Bind). К образцам добавляли изопропанол из расчёта 500 мкл на каждый 1 мл тризола, перемешивали и инкубировали 10 минут при -20°C. После инкубации центрифугировали 10 минут на 12000g при 4°C. Далее сливали надосадочную жидкость и добавляли к осадкам ледяной 75% этанол из расчёта 1 мл на каждый 1 мл тризола, образцы аккуратно перемешивали. После центрифугировали ещё 5 минут на 7500g при 4°C, отбирали досуха спирт и сушили осадки РНК на льду около 10-20 минут. Полученные образцы РНК разводили в 30 мкл воды, свободной от нуклеаз (NFW, Thermo Fisher Scientific™, USA) и хранили при -70°C. Концентрацию измеряли на спектрофотометре NanoDrop™One (Thermo Scientific™, USA), чистоту полученной РНК определяли по соотношению пиков 260/280. Также измеряли концентрацию на флуориметре Qubit 3.0 (Thermo Scientific™, USA) с использованием коммерческого набора Qubit RNA HS Assay Kit (Thermo Scientific™, USA).

Целостность выделенной РНК проверяли электрофорезом в 1% агарозном геле в TAE буфере (40 mM трис-ацетат; 1mM ЭДТА; pH = 7.6) с бромистым этидием в качестве флуоресцентного красителя.

Синтез кДНК и постановка ПЦР в режиме реального времени

Всю пробоподготовку проводили в стерильных условиях ламинар-бокса. Видоспецифичные префиксы (St) используются в тексте для определения генов *S. tuberosum*: *StWRKY29*, *StRbohD*, *StPR-1b*, *StEDS5*, *StSERK3/BAK1*, *StPARP1*, *StPARG*, *StEF-1α* и *StCox*.

Перед синтезом кДНК образцы обрабатывали выделенной тотальной РНК ДНКазой I (ThermoFisher, USA). На один образец брали 3 мкг РНК, к нему добавляли 0,3 мкл ДНКазы и 0,9 мкл транскрипционного буфера (10X Reaction Buffer with MgCl₂, ThermoFisher, USA), далее смесь доводили до 8 мкл

стерильной водой. Инкубировали образцы в течение 20 минут при 37°C, после чего проводили терминацию при 75°C – 10 минут.

Обработанную ДНКазой РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с использованием системы синтеза первой цепи SuperScript™ для ОТ-ПЦР (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США) либо с праймером олиго-dT (для мРНК, специфичных для растения-хозяина), либо с праймерами, специфичными для PVY или PVX и 1 мкл 10 мМ дезоксинуклеотидов (dNTP, Евроген, Россия), после чего прогревали полученную смесь в течение 5 минут при 65°C для плавления вторичной структуры РНК. В это время готовили смесь с ревертазой SuperScript III RT (ThermoFisher, USA): 5x First-Strand Buffer (ThermoFisher, USA) 4 мкл; 0.1M DTT 1 мкл; стерильная вода 1 мкл, ревертаза 1 мкл.

После инкубации при 65°C, образцы охлаждали на льду и добавляли к ним подготовленную смесь с ревертазой. Инкубировали полученные образцы при 50°C в течение 30-60 минут, после чего терминировали обратную транскрипцию в течение 15 минут при 70°C. Пары праймеров для анализа ПЦР в реальном времени на основе SYBR green РНК PVY, PVX и мРНК картофеля были разработаны с использованием базы данных Phytozome Plant Genomics Resource Resource (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal>) и программного обеспечения PRIMER EXPRESS (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) таблица 2). Далее проводили анализ с помощью ПЦР в реальном времени на основе SYBR green, как описано ранее [97]. Значения C_t для РНК PVY были нормализованы с использованием двух внутренних эталонных генов, кодирующих фактор элонгации StEF-1 α [98] и субъединицу 1 цитохром-с-оксидазы (StCOX) [99].

Таблица 2. Олигонуклеотидные последовательности для анализа экспрессии методом ПЦР в режиме реального времени.

Название	5'-3' последовательность	Источник
----------	--------------------------	----------

PVY ^O -F PVY ^O -R	TATGATGGATTTGGCGACCACTTGT TAAACTAGGCAGCTCTGCATCATG	[100]
PVY ^{NTN} -F PVY ^{NTN} -R	AACAATGAAGCACGGTTGCC CCAATGCGCAATGCTACTCC	
PVX-F PVX-R	AACTGGCAAGCACAAGGTTTCA CAGTTTGGGCAGCATTTCATTTC	[101]
StWRKY29 -F StWRKY29-R	TGAACAAAAGAGAGTGGTGCTTCA TTTTCTCCAAGCCATTTATCAG	[102]
StPR-1b-F StPR-1b-R	GTATGAATAATTCCACGTACCATATGTTC GTGGAAACAAGAAGATGCAATACTTAGT	[103]
StEDS5-F StEDS5-R	GGACCTTTGATGAGTCTTATTG CATGCCAAGCCTCGAATCTG	[104]
StRbohD-F StRbohD-R	CGGTTTCAATGCCTTTTGGT TGGACTATGAGGAGAGAATAGACAATG	[102]
StSERK3-F StSERK3-R	TGTTTGGCTACGGAGTTATGC, GCAAGTCGAGCAAGATCAAA	[105]

StPARP1-F StPARP1-R	GCCATGGAAAGCTGAGTATG GCCACATCGGCATTAATCCATC	[106]
StPARG-F StPARG-R	AGGAAGAAATTCGATTTATGA GAGGCATGCCTGGTATAACTCG	[106]
StCOX-F StCOX-R	GGTCGGACATACCTGAAAC CCAAAAGTATGAAAAGCTGGAG	[103]
StEF-1 α -F StEF-1 α -R	CTTGACGCTCTTGACCAGATT GAAGACGGAGGGGTTTGTCT	[98]

Производство и очистка дцРНК

кДНК, соответствующая консервативному фрагменту гена репликазы PVY [107], имеющему длину 500 п.н. (нуклеотиды 7739–8238; номер доступа в Банке генов OR545670) или кДНК, имеющая длину 918 п.н. (nts 7338–8255; номер доступа в GenBank AB711155.1), и кДНК, соответствующая фрагменту области вирусного гена PVS RdRP и TGBp1, имеющий длину 499 п.н. (nts 5874–6373; инвентарный номер Банка генов LN851189), были синтезированы компанией «Евроген» (Москва, Россия) и клонированы в плазмидный вектор L4440 (плазмида 1654; Addgene Watertown, MA, США). Этот вектор содержит два промотора T7 в инвертированной ориентации, которые фланкируют многочисленные сайты клонирования. Рекомбинантный вектор L4440 трансформировали в штамм *Escherichia coli* HT115 (DE3) с помощью стандартных процедур трансформации [108]. Этот штамм не продуцирует РНКазу III, фермент, расщепляющий дцРНК. Транскрипцию, опосредованную РНК-полимеразой T7, индуцировали изопропил- β -d-1-тиогалактопиранозидом (IPTG; 1 ммоль/л). Бактериальные культуры

центрифугировали при $5000\times g$ в течение 10 мин при 4°C . После удаления супернатанта бактериальный осадок ресуспендировали в буфере для экстракции (5% сахараза, 50 мМ ЭДТА, 50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 0,75 М NH_4Cl , 0,5% тритон X-100), содержащем лизоцим в конечной концентрации 100 мкг./мл (для экстракции тотальной РНК), нагревали до 65°C в течение 5 минут и центрифугировали при $20\ 000\times g$ в течение 10 минут. Супернатант смешивали с 0,7 объема изопропанола, перемешивали и центрифугировали при $10000\times g$ в течение 10 мин. Осадок тотальной РНК дважды промывали 70% этанолом, сушили при комнатной температуре в течение 30 мин, а затем для увеличения выхода правильно спаренных дуплексов РНК растворяли в 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 2,5 мМ MgCl_2 , 0,1 мМ CaCl_2 , нагревают 5–10 мин при температуре 95°C и постепенно охлаждают до комнатной температуры (в течение не менее 90 мин). Очищенную дцРНК определяли количественно с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 и исследовали в 1,2% ТВЕ-агарозном геле.

Обработка растений экзогенной дцРНК

Раствор дцРНК в воде Milli Q (40 мкг на лист) наносили на листья растений в присутствии 1000-кратно разведенного поверхностно-активного вещества (Silwet® L-77; Momentive, Нискаюна, Нью-Йорк, США) или 2000-кратно разведенного поверхностно-активного вещества (Неон 99) с помощью распылителя. Затем, через 24 часа после применения дцРНК или буфера (включая поверхностно-активное вещество), растения подвергали механической инокуляции вирусом. В качестве контроля использовали растения, инокулированные вирусом без нанесения дцРНК и здоровые растения, обработанные буфером (включая ПАВ). Каждый тест состоял из 4 растений на обработку, повторявшихся четыре раза.

Нозер-блот анализ

Ткани листьев (от 1 до 2 г) замораживали в жидком азоте и измельчали в мелкий порошок в ступке пестиком, а общую РНК экстрагировали с помощью TRI REAGENT в соответствии с рекомендациями производителя

(Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США). РНК суспендировали в 50 мкл воды, обработанной DEPC. Низкомолекулярные (LMW) РНК выделяли и разделяли электрофорезом в гелях полиакриламид/7М мочевины, которые затем подвергали электроблоттингу на мембранах Hybond N перед УФ-сшивкой с использованием StrataLinker (Stratagene, Ла-Хойя, Калифорния, США), как описано ранее [109]. [³²P]-меченные РНК-зонды, соответствующие фрагменту РНК PVY длиной 918 п.н. (нуклеотиды 7338–8255), были получены из продуктов ПЦР, полученных из рекомбинантного вектора L4440, описанного выше, с использованием набора mMESSAGING mMACHINE T7 (Ambion Inc., Остин, Техас, США) с помощью системы мечения ДНК со случайным праймингом (Invitrogen). В качестве контроля загрузки равные фракции каждого образца разделяли на 1% агарозном геле и окрашивали бромидом этидия (EtBr). Аналогичные результаты были получены в трех независимых экспериментах.

Окрашивание каллозы

Для выявления каллозы листья картофеля очищали 95% этанолом в течение ночи и окрашивали 150 мМ K₂PO₄ (рН 9,5), 0,01% анилиновым синим в течение 2 ч [110]. Листья исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica MZ FL III. Количество отложений каллозы подсчитывали с помощью программного обеспечения ImageJ 1.43U (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>, по состоянию на 25 мая 2022 г.). Анализировали и усредняли более 10 соседних полей зрения по длине листа (не включая среднюю жилку и край листа).

Иммунологическое обнаружение поли(АДФ-рибозы) (PAR)

Для выделения ядер растений и экстракции ядерных белков использовали набор CellLytic PN (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) [111]. Уровень накопления PAR анализировали методом ELISA, используя 5 мкг белка. В качестве захватывающего реагента применяли очищенное моноклональное антитело к PAR (Trevigen, Гейтерсберг, Мэриленд, США), в качестве детектирующего агента — кроличье антитело против PAR (Trevigen,

Гейтерсберг, Мэриленд, США), а в качестве репортера — козье антикроличье антитело, конъюгированное со щелочной фосфатазой (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) [112]. Полимер PАР (Trevigen, Гейтерсбург, Мэриленд, США) использовали в качестве положительного контроля.

Высокопроизводительное секвенирование

Подготовку библиотек РНК и малыхРНК, а также секвенирование проводилось в компании CeGaT GmbH (Германия). Библиотеки для секвенирования РНК были подготовлены с использованием многожильной тотальной РНК TruSeq в сочетании с набором Ribo-Zero (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США). Секвенирование библиотечного пула проводилось с использованием платформы Illumina NovaSeq 6000 со стратегией парного секвенирования 1 × 100 п.н. Малые РНК готовили для секвенирования с использованием набора NEXTFlex Small RNA-Seq v3 (Bio Scientific, Gympa, Австралия), которые затем секвенировали с помощью Illumina NovaSeq 6000 с длиной однократного считывания 50 нуклеотидов. Демультимплексирование чтений выполнялось с использованием Illumina bcl2fastq v2.20 через CeGaT GmbH. Адаптеры были удалены с помощью Skewer v0.2.2. Качество чтения оценивалось с помощью инструментов FastQC v0.11.9 [113] и SeqKit v2.3.0 [114]. Библиотеки РНК-seq с удаленными адаптерами были депонированы в Архив чтения последовательностей (SRA) базы данных NCBI, номер доступа проекта BioProject PRJNA1002225, PRJNA1018135 и PRJNA13227266.

Биоинформатический анализ

De novo сборка последовательностей проводилась с использованием алгоритмов: Trinity v2.14.0 (стандартная длина k-мера — 25 нуклеотидов) и rnaviralSPAdes v3.15.4 (стандартные k-меры — 21, 33 и 49 нуклеотидов) [115, 116]. Статистические показатели качества сборки (длина контигов, N50 и др.) оценивали с помощью программного обеспечения QUAST v5.2.0 [117].

Контиги длиной больше 9000 нуклеотидов относили к вирусу картофеля Y на основе их сходства с репрезентативным набором геномов PVY, выявленным методом BLAST-поиска. Такие контиги отбирали для

дальнейшего анализа и отделяли от прочих с использованием пользовательского скрипта на языке Python v3.11.3 [118]. Трансляцию собранных нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью NCBI ORFfinder v0.4.3. Все полноразмерные контиги содержали единственную протяжённую открытую рамку считывания, охватывающую практически весь геном.

Таксономическую классификацию нуклеотидных и соответствующих транслированных аминокислотных последовательностей проводили с использованием алгоритма BLAST (BLASTn v2.14.0+) и баз данных NCBI. Для оценки качества сборки и корректировки возможных ошибок исходные чтения сопоставляли с полученными контигами. Картирование выполняли с помощью HISAT2 v2.1.0 [119], а обработку файлов форматов SAM/BAM осуществляли с использованием пакета Samtools v1.10 [120]. Сборку проверяли на наличие ошибок в отдельных нуклеотидах, коротких вставок и делеций, а также точек останова (накопления мягко и жёстко обрезанных прочтений) с применением программы Tablet v1.19.09.03 [121].

Последовательности отобранных полноразмерных *de novo* контигов PVY были депонированы в базе данных GenBank NCBI. Среди собранных контигов были также идентифицированы последовательности других вирусов картофеля, включая вирус картофеля М (PVM), вирус картофеля S (PVS), вирус скручивания листьев картофеля (PLRV) и вирус картофеля Р (PVP).

Множественные выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей выполняли независимо с использованием программ Clustal Omega (ClustalO) v1.2.3 [122] и MUSCLE v3.8.1551 [123] с настройками по умолчанию. Для устранения плохо выровненных и высоковариабельных участков применяли Gblocks v0.91b [124] с параметрами по умолчанию; отобранные консервативные фрагменты объединяли. 5'- и 3'-концевые участки последовательностей обрезали для получения выравнивания, соответствующего полной открытой рамке считывания («полная ORF»). Все

полноразмерные контиги характеризовались достаточным непрерывным покрытием прочтениями соответствующих NGS-библиотек.

Филогенетический анализ выполняли методом максимального правдоподобия (ML) с использованием модели GTR+G+I, в программном обеспечении MEGA X v10.2.4 [125] при 1000 бутстреп-повторах. Полученные деревья визуализировали с помощью веб-сервиса iTOL v6.8 [126].

Анализ малых РНК, ассоциированных с вирусной инфекцией

Обработку прочтений малых РНК начинали с фильтрации и удаления чтений короче 18 и длиннее 30 нуклеотидов с использованием пакета prinseq-lite. Очищенные чтения сопоставляли с референсным геномом PVY^{NTN} (OR545670) с помощью bowtie2 v2.3.5.1 [127], не допуская несоответствий. Результаты картирования визуализировали с использованием пользовательских скриптов MISIS-2, Microsoft Excel и Python v3.11.3. Для работы с файлами форматов SAM/BAM также применяли Samtools v1.10.

Для анализа вирус-ассоциированных малых интерферирующих РНК (vsiРНК) референсную последовательность генома PVY^{NTN} использовали в качестве шаблона для картирования 18–30-нуклеотидных чтений из каждой библиотеки. Далее отсортированные малые РНК подсчитывали по длине, полярности и нуклеотидной принадлежности 5'-конца (5'A, 5'C, 5'G и 5'U) с использованием собственных скриптов.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили на четырех независимых биологических повторах. Каждый повтор состоял из собранных вместе образцов трех растений (по два листа на растение). Статистический анализ и построение графиков выполняли с использованием Python версии 3.7.5 [118]. Для оценки влияния экспериментальных факторов применяли двух- или многофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), а для множественных сравнений средних значений использовались тесты Тьюки (HSD). Для оценки величины эффекта между экспериментальными и контрольными группами рассчитывали размер эффекта Cohen's d.

Для оценки α -разнообразия популяций вируса картофеля Y использовали индекс разнообразия Шеннона (H'), рассчитываемый на основе относительных долей рекомбинантных типов вируса. В качестве $p_{ip_ip_i}$ использовали долю полноразмерных геномных контигов, относящихся к каждому рекомбинантному типу PVY, от общего числа PVY контигов в соответствующей региональной выборке.

Расчёт индекса Шеннона проводили только для регионов с расширенными выборками, обеспечивающими устойчивую оценку структуры вирусной популяции (Московская и Астраханская области). Для остальных регионов число проанализированных образцов было ограничено (1–4 образца), что не позволяет надёжно оценить относительные доли минорных рекомбинантных вариантов и приводит к смещению значения индекса за счёт эффекта малой выборки. В связи с этим для малых региональных выборок индекс Шеннона не рассчитывали, а анализ разнообразия носил описательный характер.

Различия считались достоверными, если значения P-value не превышали 0.05; использовали 3 степени достоверности: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Влияние экзогенной PVY-специфической двуцепочечной РНК на накопление вируса картофеля Y в растениях *S. tuberosum*

Способность экзогенно наносимой двуцепочечной РНК (дцРНК) индуцировать защиту от вируса картофеля Y оценивали на растениях *Solanum tuberosum* сорта Индиго с использованием дцРНК, продуцируемой в бактериальной системе *Escherichia coli*, PVY-специфическая дцРНК (дцРНК_{pvу}) размером 910 и 504 пар нуклеотидов были гомологичны консервативному фрагменту гена репликазы штаммов PVY^O и PVY^{NTN} соответственно. Препарат дцРНК_{pvу} наносили на 2-3 листа растений картофеля на стадии 5-6 листьев в количестве на лист в присутствии абразива (целита) и поверхностно-активного вещества (Неон 99) методом опрыскивания. Инокуляцию PVY проводили через 24 ч после обработки дцРНК.

Показано, что однократная обработка дцРНК_{pvу} обеспечивает существенное снижение накопления вирусной РНК в системно инфицированных листьях в течение как минимум 14 дней после заражения по сравнению с контрольными растениями (обработка буфером или обработка дцРНК_{pvs}) (рис. 7).

Однако со временем подавляющий эффект дцРНК_{pvу} уменьшался: к 14 дню после инфицирования степень ингибирования вирусной репликации снижалась, а к 19 дни практически исчезала, что приводило к накоплению вируса на уровне, сопоставимом с контролем. В контрольных вариантах, где растения обрабатывали буфером или неспецифической дцРНК_{pvs} защитного эффекта по отношению к инфекции PVY не отмечалось (рис. 7).

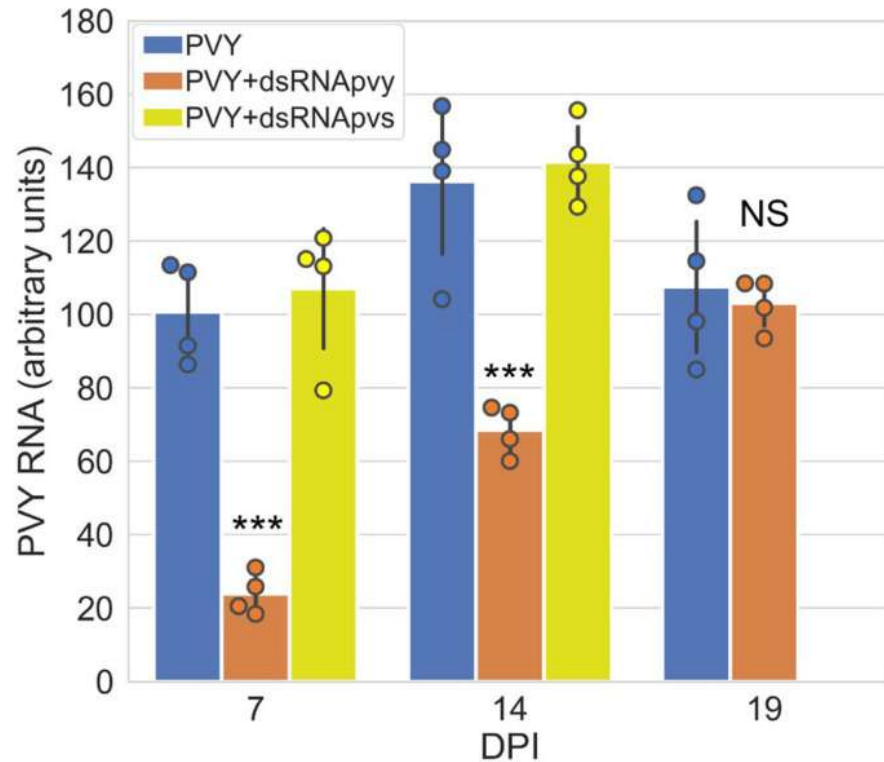


Рисунок 7. Уровни накопления РНК PVY в системно инфицированных листьях растений картофеля сорта Индиго в течение 7–19 дни. Уровни экспрессии РНК PVY были нормализованы к уровням внутреннего контроля, *StEF-1α* и *StCox*. Статистический анализ проводили на четырех независимых биологических повторах. Данные средние ± стандартное отклонение. По данным ПЦР-РВ были проведены пост-хоковые тесты (HSD) ANOVA и Tukey's. *** $p < 0,001$; не существенно.

В следующей схеме эксперимента дцРНК наносили еженедельно, что обусловило устойчивое подавление экспрессии вирусной РНК, сохранявшееся до 14 и 21 дни по сравнению с контролем (растения, обработанные буфером) (рис. 8А).

Специфичность защитного эффекта дцРНК_{pvу} оценивали по реакции растений, инфицированных вирусом картофеля Х. В отличие от вариантов с инфекцией PVY (рис. 8А), при инокуляции PVX после обработки дцРНК_{pvу} защитный эффект не наблюдался (рис. 8В).

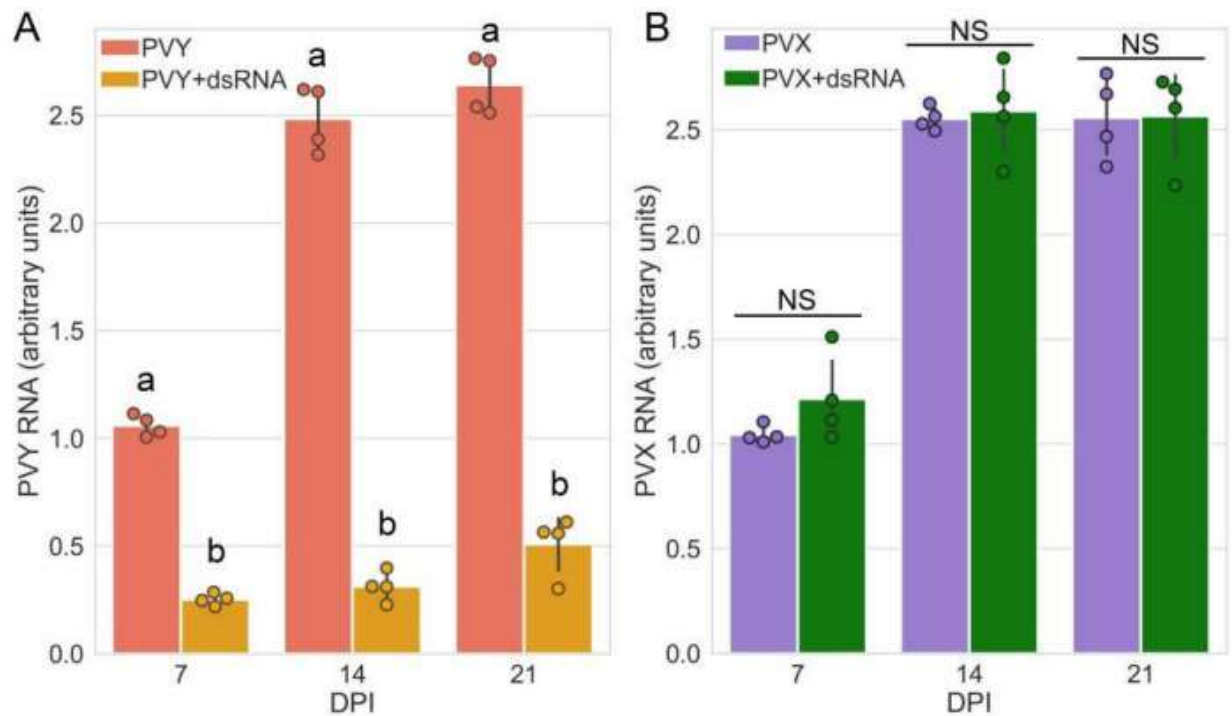


Рисунок 8. Уровни накопления РНК PVY (A) и РНК PVX (B) в системно инфицированных листьях растений картофеля сорта Индиго на 7, 14 и 21 дни. Уровни экспрессии РНК PVY и РНК PVX были нормализованы до уровня внутреннего контроля, *StEF-1α* и *StCox*. Статистический анализ проводили на четырех независимых биологических повторах. Данные средние \pm стандартное отклонение. Каждый повтор состоял из собранных вместе образцов трех растений (по два листа на растение). По данным ПЦР-РВ были проведены пост-хоковые тесты (HSD) ANOVA и Tukey's. Различные буквы (a, b) указывают на значительно разные значения ($p < 0,001$) накопления РНК PVY между обработанными и необработанными дцРНК растениями.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о специфичности действия экзогенно наносимой дцРНК_{pvu}, определяемой её нуклеотидной последовательностью, что согласуется с литературными данными. ДцРНК_{pvu} обеспечивала выраженное снижение вирусной нагрузки, тогда как накопление вируса в контрольных вариантах (заражённые PVY растения без обработки дцРНК_{pvu} либо с обработкой неспецифической дцРНК_{pvs}) оставалось высоким.

В эксперименте было продемонстрировано, что антивирусный эффект дцРНК может быть пролонгирован за счёт повторных еженедельных обработок. В первой экспериментальной схеме повторные обработки

намеренно не проводили, чтобы исключить возможные искажения результатов анализа малых РНК, связанные с наложением эффектов последовательных нанесений дцРНК. На следующем этапе исследования были проанализированы механизмы действия дцРНК, лежащие в основе индуцируемых ею иммунных реакций в растениях картофеля.

3.2. Молекулярные механизмы действия экзогенной PVY - специфической дцРНК в индукции иммунных реакций у растений картофеля

Имеются противоречивые данные относительно способности дцРНК, экзогенно наносимой на листья, к системному транспорту в растении. В ряде работ показано, что экзогенно внесённая двуцепочечная РНК способна перемещаться системно по растению, включая табак и томат, что обеспечивает распространение эффекта сайленсинга за пределы зоны обработки [68, 87]. В то же время в ряде исследований показано отсутствие системного переноса экзогенно нанесённой двуцепочечной РНК: в работах Téllez et al. и Díaz-Ruiz et al. [128], а также Rego-Machado et al. [129] не было выявлено присутствия дцРНК в необработанных листьях табака и томата после её нанесения на листья.

С целью изучения системного транспорта дцРНК_{PVY} в растениях картофеля была проведена оценка присутствия дцРНК_{PVY} в листьях растений в проведённых опытах. Анализ покрытия генома PVY показал, что в библиотеках, полученных как из инокулированных, так и из неинокулированных листьев, инфицированных PVY растений, прочтения были относительно равномерно распределены по всему геному PVY. В отличие от этого, в образцах растений, обработанных только дцРНК_{PVY} (на 7 дни), регистрировались прочтения РНК, соответствующие исключительно участку генома PVY, использованному для дизайна и синтеза дцРНК (рис. 9А). Более того, число прочтений, индуцированных дцРНК в целевом фрагменте генома, заметно превышало количество прочтений, индуцированных PVY-

инфекцией, что указывает на способность двуцепочечной РНК проникать в ткани листа.

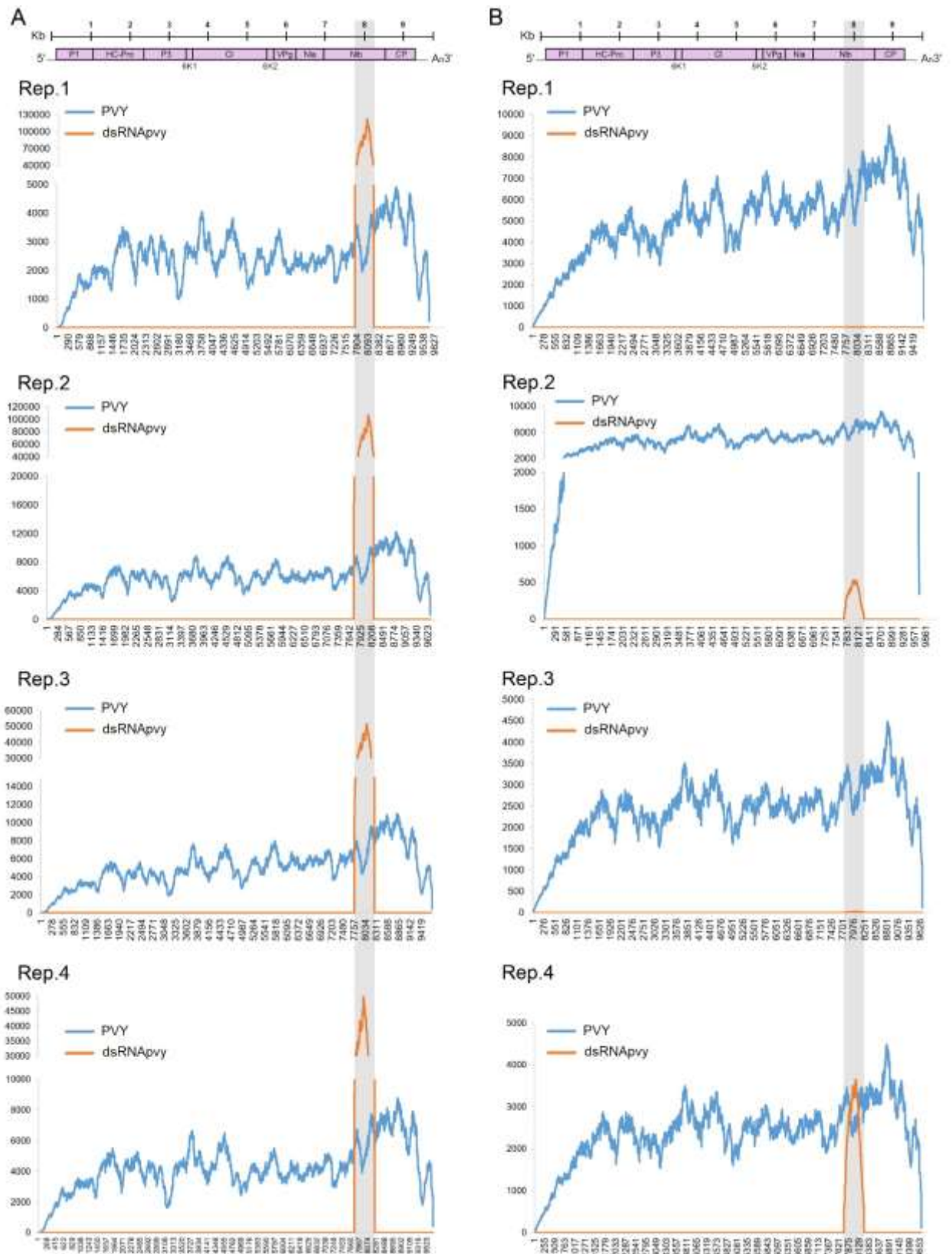


Рисунок 9. Распределение покрытия прочтений по геному PVY^{NTN} в образцах, обработанных дсРНКpvv (А) и необработанных (В) листьев. В качестве контроля показано

покрытие последовательностей PVY в инокулированных (А) и системных (В) листьях, инфицированных PVY растений. Отдельные графики соответствуют независимым биологическим повторам (Rep). Схематическая организация генома PVY представлена над графиками; целевая область PVY, использованная для дизайна дцРНК_{pvу}, выделена серым цветом.

Последовательности дцРНК_{pvу} были обнаружены в необработанных листьях, однако лишь в двух из четырёх биологических повторов, причём количество таких прочтений в необработанных листьях было значительно ниже, чем в обработанных (рис. 9В). Следует подчеркнуть, что «необработанные» листья, использованные для анализа, сформировались уже после нанесения дцРНК и отбирались с соблюдением максимальных мер стерильности. Тем не менее, полностью исключить возможность контаминации этих листьев незначительным количеством дцРНК нельзя. Более вероятным, однако, представляется объяснение, что присутствие дцРНК_{pvу} в необработанных листьях обусловлено её физиологическим перемещением *in planta*, что согласуется с предыдущими сообщениями. Такое системное перемещение дцРНК в растениях картофеля, по-видимому, ограничено, и основная часть нанесённой дцРНК остаётся в обработанных листьях.

Многочисленные исследования, демонстрирующие противовирусную защиту, индуцированную наружным применением дцРНК (SIGS, *spray-induced gene silencing*), поддерживают представление о том, что защитный эффект экзогенно наносимой дцРНК обусловлен РНК-опосредованным ответом, который препятствует вирусной инфекции последовательно-специфическим образом [130].

Анализ низкомолекулярных РНК методом нозерн-блоттинга в образцах из растений, инфицированных вирусом картофеля Y, подтвердил образование вирусспецифических малых интерферирующих РНК при инфекции PVY. При этом растения, инфицированные PVY и дополнительно обработанные

дцРНК_{pvu}, демонстрировали повышенное накопление PVY-специфических миРНК (рис. 10).

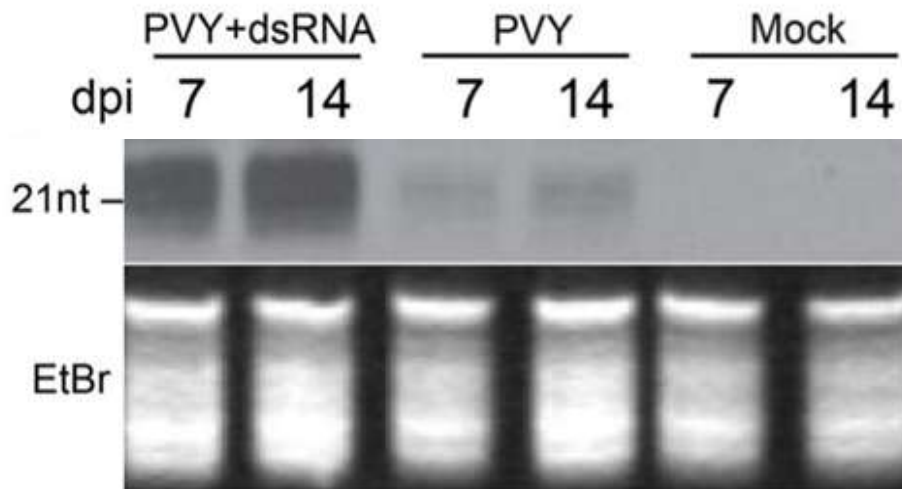


Рисунок 10. Образование PVY-специфических миРНК, индуцированное экзогенным применением дцРНК_{pvu} (штамм O) через 7 и 14 дней после обработки. В качестве контроля использовали незаражённые растения и растения, инфицированные PVY^O и не обработанные дцРНК_{pvu}. Образцы 5S рРНК + тРНК, окрашенные бромидом этидия (EtBr), приведены в качестве контроля загрузки.

В присутствии дцРНК инфекция PVY приводила к избыточному накоплению миРНК, что тесно коррелировало со снижением уровня вирусной РНК PVY (рис. 8А) и подтверждает участие механизма РНК-интерференции в опосредованной дцРНК защите от PVY.

Показано, что GFP-специфическая дцРНК, дцРНК, выделенная из растений, инфицированных OSMV, а также синтетические аналоги дцРНК (поли(I:C)) способны индуцировать типичные ответы иммунитета, индуцированного паттернами (PTI), у *Arabidopsis thaliana* [67].

В связи с этим мы исследовали вирусспецифическую дцРНК как возможный элиситор паттерн-индуцированного иммунитета (PTI) у картофеля и оценили, способна ли она индуцировать PTI-подобные сигнальные пути в наших экспериментах. Гены-маркеры PTI у картофеля были отобраны на основе литературных данных о генах, индуцируемых каноническими элиситорами PTI, такими как *flg22*, *elf18* (elongation factor Tu) и *Per25*

(олигопептидный фрагмент белка клеточной стенки *Phytophthora sojae* массой 42 кДа).

Полученные результаты показали, что дцРНК_{rvu} стимулирует экспрессию ряда генов, традиционно ассоциированных с активацией РТИ. В частности, дцРНК_{rvu} повышала экспрессию генов *WRKY29* (фактор транскрипции *WRKY29*), *RbohD* (гомолог D NADPH-оксидазы респираторного всплеска), *EDS5* (Enhanced Disease Susceptibility 5), *SERK3* (Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase 3) и *PR-1b* (патогенез-ассоциированный белок 1b). Такая активация РТИ-ассоциированных генов свидетельствует о том, что дцРНК_{rvu} запускает комплексный клеточный ответ, включающий различные молекулярные компоненты защитных реакций растений против вирусной инфекции (рис. 12А–Е) [131].

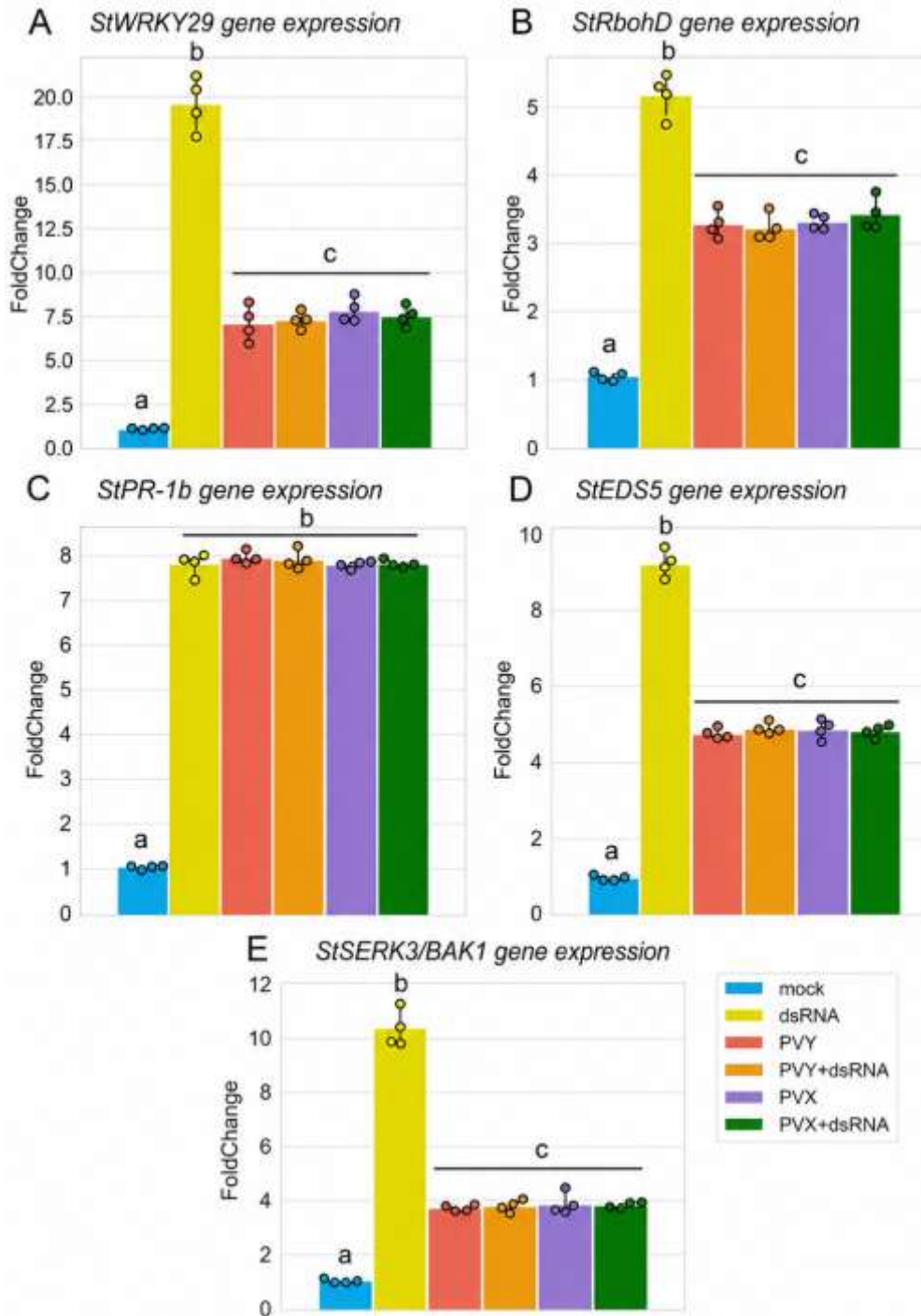


Рисунок 12. Экспрессия генов-маркеров РТИ у растений картофеля при заражении PVY и PVX под воздействием дцРНКру. (А–Е) Характер экспрессии генов, связанных с РТИ, *StWRKY29* (А), *StRbohD* (В), *StPR-1b* (С), *StEDS5* (D) и *StSERK3/BAK1* (Е), проанализированных с помощью ПЦР-РВ в системных или mock листьях через 7 дней после обработки. Уровни экспрессии мРНК были нормализованы к уровням внутреннего контроля, *StEF-1a* и *StCox*. Статистический анализ проводили на четырех независимых биологических повторах. Данные средние \pm стандартное отклонение. Каждый повтор состоял из собранных вместе образцов трех растений (по два листа на растение). На

полученных данных был проведен дисперсионный анализ и апостериорные тесты Тьюки HSD. Разные буквы (а, б, в) обозначают существенно разные значения ($p < 0,001$).

Учитывая, что механизмы дцРНК-опосредованного РТИ у *Arabidopsis thaliana* и *Nicotiana benthamiana* включают усиленное отложение каллозы в плазмодесмах, что может ограничивать межклеточный транспорт вирусов, мы проверили, способна ли дцРНК_{rvu} аналогичным образом увеличивать отложение каллозы у картофеля. Как показано на рис. 13А–С, растения картофеля также отвечали на обработку дцРНК_{rvu} усиленным отложением каллозы.

Примечательно, что PVY и PVX сами по себе также стимулировали экспрессию тех же РТИ-реагирующих генов и отложение каллозы, хотя и в меньшей степени, чем при обработке одной дцРНК_{rvu}. Это позволяет предположить, что активация РТИ-сигнальных путей является подлинной реакцией растений на эти вирусы. Вместе с тем как PVY, так и PVX существенно снижали способность дцРНК_{rvu} индуцировать отложение каллозы и экспрессию всех исследованных РТИ-чувствительных генов, за исключением *PR-1b*. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что вирусы растений обладают механизмами подавления РТИ-опосредованных защитных реакций хозяина.

Некоторые вирусные белки, например, Р6 вируса мозаики цветной капусты и транспортный белок (ТВ) вируса табачной мозаики (CaMV), обладают способностью супрессировать РТИ, в частности подавлять активацию РТИ-связанных генов в растениях [132].

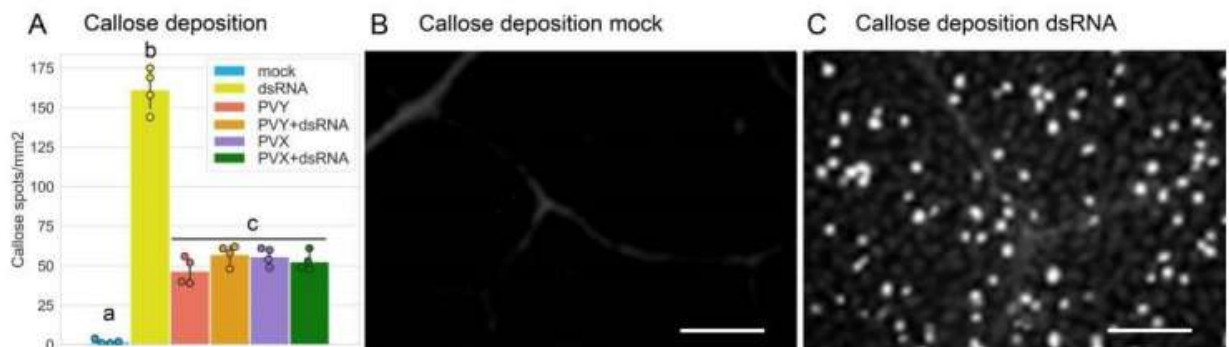


Рисунок 13. Влияние дцРНК_{rvu} на отложение каллозы в листьях растений картофеля сорта Индиго, инфицированных PVY и PVX. (А) Количественная оценка отложения каллозы в системных и моск-листьях через 7 дней после обработки. Статистический анализ выполнен по четырём независимым биологическим повторам; данные представлены как среднее \pm SD. Выполнены дисперсионный анализ и апостериорный тест Тьюки (HSD); различные буквы (a, b, c) обозначают статистически значимые различия ($p < 0,001$). (В, С) Микроскопические изображения отложения каллозы в листьях контрольных растений (В) и растений, обработанных дцРНК_{rvu} (С), через 7 дней после обработки. Масштабная линейка — 50 мкм.

Таким образом, полученные нами результаты показывают, что дцРНК_{rvu} способна индуцировать два независимых механизма защиты: РНК-интерференцию и РТИ. При этом РНК-интерференция эффективно подавляет инфекцию PVY, тогда как РТИ-опосредованные реакции оказываются недостаточными для полного подавления других вирусов, таких как PVX. Следовательно, ключевую роль в противовирусном действии дцРНК_{rvu} играет именно РНК-интерференция, тогда как вклад РТИ-опосредованных реакций является ограниченным.

Поли(АДФ-рибозилирование) белков (РАРилирование), осуществляемое полимеризующей активностью поли(АДФ-рибозо)-полимераз (PARP) и последующим удалением PAR-цепей поли(АДФ-рибозо) гликогидролазами (PARG), является важным регуляторным компонентом иммунного ответа растений [133–135]. PARG рассматривается как положительный регулятор толерантности к биотическому стрессу. У *Arabidopsis* идентифицировано два гена PARG: *PARG1* и *PARG2*. При этом для *AtPARG1* показана гликогидролазная активность *in vivo* и *in vitro*, тогда как *AtPARG2* такой активностью не обладает, что может указывать на функциональную дивергенцию этих генов в иммунитете растений.

Обработка растений *Arabidopsis* классическим пептидным сигналом биотического стресса flg22 приводила к транзientной индукции мРНК *PARG1* и повышению экспрессии мРНК *PARG2*, что свидетельствует о вовлечённости обоих генов в иммунный ответ на биотический стресс [135]. Повышение

уровня транскриптов *PARG2* также отмечено у растений, устойчивых к вирусу мозаики огурца (CMV) [136]. В то же время генетическое выключение *PARG1* у нокаутных линий *Arabidopsis* приводило к усилению flg22-индуцированного отложения каллозы и повышению экспрессии генов, регулируемых flg22 [135]. Появление симптомов, вызываемых *Botrytis cinerea*, ускорялось как у мутантных растений *PARG1*, так и *PARG2* [137]. В совокупности эти данные демонстрируют тесную связь между метаболизмом поли(АДФ-рибозы) и РТИ и позволяют предполагать, что PARG функционируют как регуляторные элементы интегрированной защитной сети, а не как компоненты строго специфического сигнального пути.

В связи с этим нами было исследовано влияние дцРНК_{rvu} на экспрессию генов метаболизма поли(АДФ-рибозы) у картофеля методом ПЦР-РВ. Для анализа был выбран ген *StPARP1* (Soltu.DM.03G032200.1), являющийся гомологом *AtPARP1*, который считается основной PARP у *Arabidopsis* [135]. В качестве представителя семейства PARG выбран ген *StPARG* (Soltu.DM.12G003820.1), содержащий характерный мотив с консервативной последовательностью «GGG-X7-QEE», необходимый для гликогидролазной активности PAR, присущей *AtPARG1*, но отсутствующей у *AtPARG2* [135].

Согласно полученным данным, дцРНК_{rvu}, а также инфекции PVY и PVX (в присутствии или отсутствии дцРНК) не оказывали существенного влияния на экспрессию гена *StPARP1* (рис. 14А). В то же время экспрессия *StPARG* значимо повышалась в ответ на обработку дцРНК_{rvu} по сравнению с необработанными растениями (рис. 14В). Инфекция PVY и PVX также стимулировала экспрессию *StPARG*, но в меньшей степени, чем обработка одной дцРНК_{rvu}. При совместном воздействии вирусной инфекции (PVY или PVX) и дцРНК_{rvu} наблюдалось снижение способности дцРНК индуцировать экспрессию *StPARG*, и уровни экспрессии этого гена приближались к уровням, характерным для растений, инфицированных соответствующими вирусами без обработки дцРНК (рис. 14В).

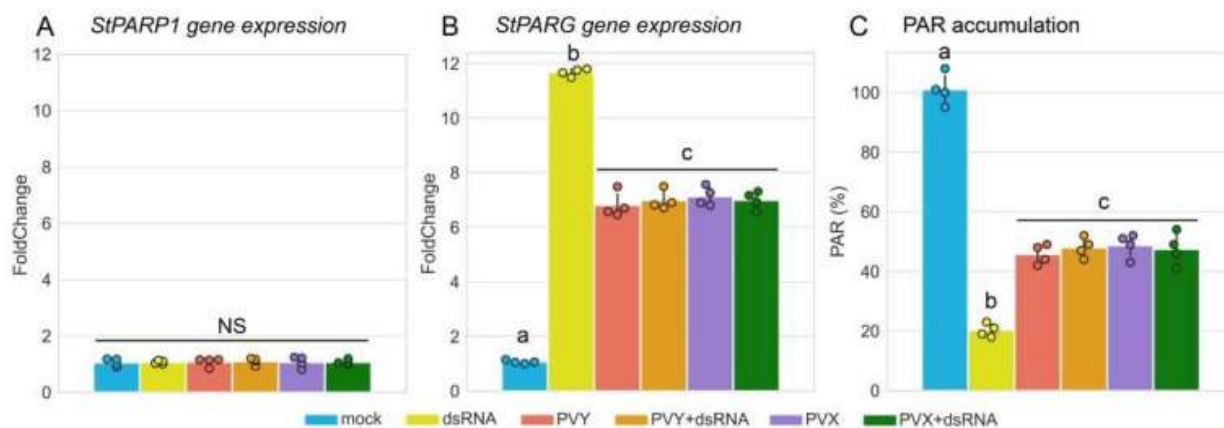


Рисунок 14. Изменения PAR-ассоциированного метаболизма у растений картофеля под действием дцРНК_{pvu} при инфекции PVY и PVX (A, B) Профили экспрессии генов *StPARP1* (A) и *StPARG* (B) по данным ПЦР-РВ через 7 дней после обработки. Уровни экспрессии мРНК нормализованы по генам внутреннего контроля *StEF-1α* и *StCox*. Статистический анализ проводили по четырём независимым биологическим повторам; данные представлены как среднее ± SD. (C) Накопление PARилированных белков, оценённое методом ELISA с использованием кроличьего поликлонального антитела против PAR, в системно инфицированных или инокулированных растениях через 7 дней после обработки. Статистический анализ выполнен по четырём независимым биологическим повторам; применены дисперсионный анализ и апостериорный тест Тьюки (HSD). Различные буквы (a, b, c) обозначают статистически значимые различия ($p < 0,001$).

Таким образом, нами обнаружена тесная корреляция между гиперэкспрессией *StPARG* усиленным отложением каллозы и повышенной экспрессией РТИ-ассоциированных генов в растениях картофеля, обработанных дцРНК_{pvu}. Похожие эффекты ранее были описаны для линий *Arabidopsis* с нокаутом *AtPARG1*, обработанных элиситором flg22 [135].

PARG рассматривается как основная гликогидролаза, участвующая в деградации PAR и предотвращающая избыточное накопление поли(АДФ-рибозы), образующейся при PARилировании белков-мишеней PARP. Растения картофеля, обработанные дцРНК_{pvu}, в присутствии или отсутствии PVX демонстрировали повышенную экспрессию *StPARG* и сниженный уровень PAR. Таким образом, усиление экспрессии *PARG* коррелирует с уменьшением уровней поли(АДФ-рибозы).

Эти данные указывают на отрицательную корреляцию между экспрессией *PARG* и уровнем PAR и позволяют предположить, что индуцированная экзогенной дцРНК_{pvu} активация *PARG* и последующие снижение PAR могут участвовать в регуляции РТИ-ассоциированных защитных реакций и формировании противовирусного иммунитета у картофеля (рис.14С).

В совокупности полученные результаты свидетельствуют о том, что противовирусный эффект экзогенной дцРНК_{pvu} преимущественно опосредован механизмами РНК-интерференции. Вместе с тем дцРНК_{pvu} способна индуцировать РТИ-ассоциированные защитные реакции, включая усиление отложения каллозы, повышение экспрессии РТИ-маркеров и изменения метаболизма, связанные с активацией *PARG* и соответствующим снижением уровня PAR. Это указывает на формирование комплексного многоуровневого противовирусного ответа растений.

Хотя роль РНК-интерференции как основного защитного механизма при применении экзогенной дцРНК хорошо охарактеризована, молекулярные механизмы, лежащие в основе дцРНК-опосредованного РТИ в противовирусной защите растений, остаются недостаточно изученными и требуют дальнейшего исследования.

3.3. Анализ профиля малых РНК в листьях *S. tuberosum* после экзогенного применения PVY - специфической дцРНК

Для оценки популяции малых РНК, образующихся при вирусной инфекции и обработки дцРНК_{pvu}, был проведён сравнительный анализ следующих вариантов обработок: (1) обработка дцРНК_{pvu}, (2) заражение PVY (3) обработка дцРНК_{pvu} с последующим заражением PVY и (4) mock (контроль). Исследование выполняли как на обработанных (инокулированных) листьях, так и на необработанных (неинокулированных, системно инфицированных) листьях с использованием данных секвенирования фракции малых РНК. Всего было получено 24 библиотеки

малых РНК (RNA-Seq) из четырёх биологических повторов контрольных и PVY-инфицированных растений на 7-е сутки после обработки.

Анализ распределения длин малых РНК показал, что как инокулированные (рис. 15А), так и верхние неинокулированные (рис. 15В) листья PVY-инфицированных растений содержали типичные вирусспецифические малые интерферирующие РНК длиной 21 и 22 нт, при этом преобладали молекулы длиной 21 нт. Полученные данные согласуются с ранее описанным распределением размеров, вирус-индуцированных малых РНК при инфекциях другими РНК-содержащими вирусами растений [138].

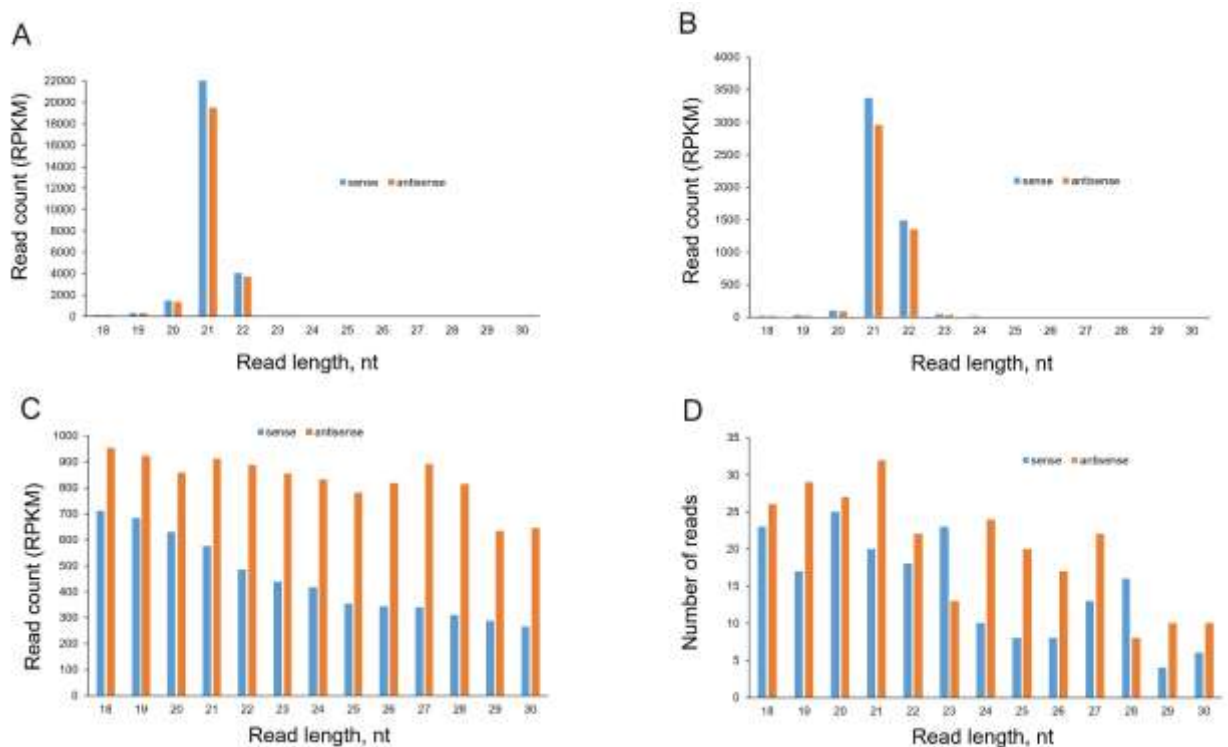


Рисунок 15. Профили размера и полярности PVY-специфичных малых РНК. Считывания малых РНК, полученные из инокулированных (А) и системно инфицированных (неинокулированных) (В) листьев PVY-инфицированных растений, а также из обработанных (С) листьев растений, обработанных дцРНК_{pvu}, сопоставляли без допущения несоответствий с референсной последовательностью PVY^{NTN}. Сопоставленные прочтения сортировали по размеру (18–30 нт) и полярности (смысловые и антисмысловые) и нормировали в виде числа чтений на миллион килобаз (RPKM) для каждой библиотеки. Представлены средние значения для четырёх биологических повторов. (D) Суммарное количество сопоставленных прочтений из необработанных листьев растений,

обработанных дцРНК_{pvu}, в которых также обнаруживались дцРНК-производные малые РНК.

В листьях неинфицированных PVY растений, обработанных только дцРНК_{pvu}, профиль малых РНК отличался от классического вирус-индуцированного. Эти малые РНК формировали «лестничный» спектр длиной от 18 до 30 нт, причём по мере увеличения длины наблюдалось постепенное уменьшение числа прочтений (рис. 15С). Такой характер распределения предполагает, что эти малые РНК, вероятно, не являются продуктами DCL-подобных ферментов, поскольку для Dicer-подобных белков характерно образование дискретных классов размеров малых РНК [139].

Тем не менее во всех образцах этих листьев регистрировались только те малые РНК, которые были строго комплементарны участку генома PVY, использованному для конструирования дцРНК_{pvu}. Это однозначно указывает на специфическое, определяемое нуклеотидной последовательностью происхождение неканонической популяции малых РНК длиной 18–30 нт (рис. 15С, D и рис. 16).

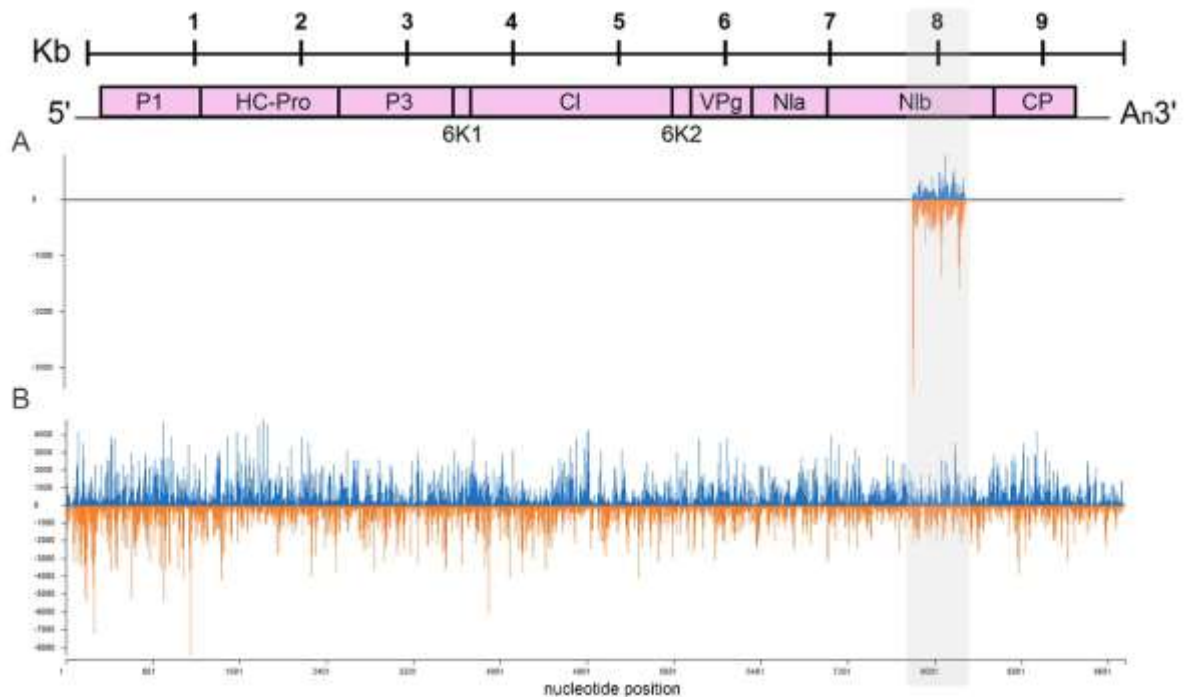


Рисунок 16. Репрезентативные карты распределения малых РНК по геному PVY с нуклеотидным разрешением, полученных из дцРНК_{pvu} (A) и PVY (B). Малые РНК

картировали на референсный геном PVY^{NTN}. Столбцы над осью представляют количество смысловых прочтений, начинающихся с данной позиции; столбцы под осью — количество антисмысловых прочтений, заканчивающихся в соответствующей позиции. Схематическая организация генома PVY показана над гистограммами; целевая область PVY, использованная для конструирования дцРНК_{pvu}, выделена серым цветом.

Для оценки способности индуцированных дцРНК_{pvu} малых РНК к системному транспорту анализировали PVY-специфичные малые РНК в верхних необработанных листьях растений после обработки нижних листьев дцРНК_{pvu}.

Малые РНК, соответствующие области дцРНК_{pvu}, были обнаружены в необработанных листьях через 7 дней после обработки в двух из четырёх биологических повторов, что указывает на возможность системного перемещения дцРНК или её производных. В случаях, когда системного перемещения дцРНК не происходило, накопление малых РНК в верхних листьях было минимальным.

Эти результаты позволяют предположить, что дцРНК, достигшая системных листьев, подвергается в них расщеплению с образованием неканонических малых РНК по аналогии с процессами, происходящими в обработанных листьях. В то же время прямых свидетельств эффективной системной подвижности самих неканонических малых РНК нами получено не было.

Далее была исследована полярность малых РНК. В обработанных дцРНК_{pvu} листьях неинфицированных растений доля антисмысловых малых РНК (комплементарных вирусному геному) составляла 64,9 % и значительно превышала количество смысловых малых РНК (35,1 %) для всех размерных классов (18–30 нт) (рис. 15С).

Аналогичная тенденция наблюдалась и в системных листьях неинфицированных растений, обработанных дцРНК_{pvu}: количество антисмысловых малых РНК было выше, чем смысловых (рис. 15D). Вирус-индуцированные малые РНК, обнаруженные в инокулированных и системно

инфицированных листьях PVY-инфицированных растений, формировались из обеих цепей вирусного генома, однако отмечался некоторый сдвиг в сторону смысловой цепи (рис. 15А, В и рис. 16).

Поскольку помимо длины малой РНК важнейшее значение для её функциональной специфичности имеет 5'-концевой нуклеотид, определяющий предпочтительную загрузку в те или иные AGO-комплексы [139, 140], далее был проведён анализ распределения 5'-нуклеотидов в антисмысловых малых РНК. Это позволило оценить потенциал различных классов малых РНК к формированию активных RISC-комплексов, способных подавлять PVY (рис. 17).

При инфекции PVY основные классы антисмысловых малых РНК (21 и 22 нт) были обогащены 5'U (~36–40 %) и 5'A (~28–29 %), за которыми следовали 5'C (~20–21 %) как в инокулированных, так и в системно инфицированных листьях (рис. 17С, D). Такой профиль согласуется с преимущественной загрузкой этих малых РНК в AGO1-, AGO2- и AGO5-подобные белки соответственно, как это было показано для *Arabidopsis* [139, 141].

Несмотря на более вариабельное распределение 5'-нуклеотидов в неканонических (18–30 нт) малых РНК, индуцированных дцРНК_{pvу}, эти молекулы также обладают достаточным содержанием 5'A, 5'U или 5'C для потенциальной загрузки в тот же набор AGO-белков (AGO1, AGO2 и AGO5), что и PVY-индуцированные виРНК (рис. 17).

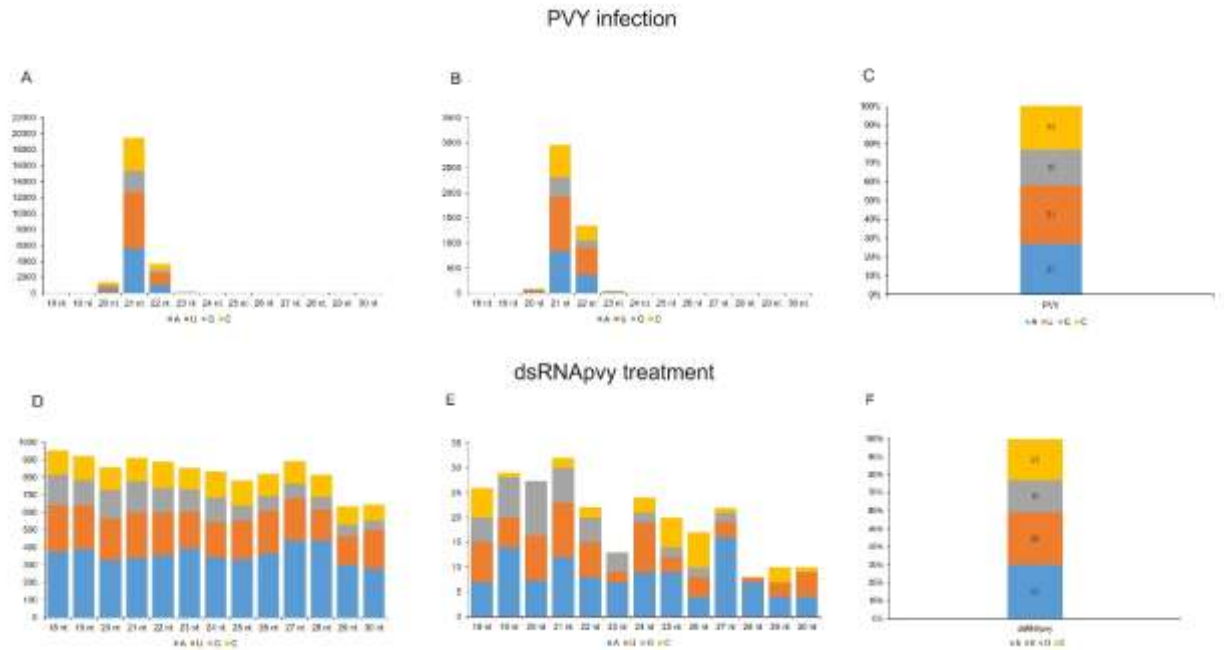


Рисунок 17. Профили 5'-нуклеотидов основных размерных классов антисмысловых малых РНК, происходящих из дцРНК_{pvу} и PVY. Считывания малых РНК из инокулированных (А) и системно инфицированных (В) листьев PVY-инфицированных растений, а также из обработанных (D) и необработанных (E) листьев растений, подвергшихся обработке дцРНК_{pvу}, картировали без несоответствий на референсную последовательность PVY^{NTN}. Картированные малые РНК сортировали по размеру и типу 5'-концевого нуклеотида (5'A, 5'C, 5'G, 5'U). Частоты каждого 5'-нуклеотида (в % от общего числа) для основных размерных классов представлены в виде цветокодированных гистограмм. (C, F) Показано процентное содержание нуклеотидов А, U, G, С в полном геноме PVY и в фрагменте, использованном для конструирования дцРНК_{pvу}, соответственно.

Сравнительный анализ профилей малых РНК в листьях растений, одновременно инфицированных PVY и обработанных дцРНК_{pvу}, показал наличие значительного пула неканонических (18–30 нт) малых РНК, точно соответствующих области генома PVY, использованной для дизайна дцРНК (рис. 18А).

Для оценки возможности того, что эти первичные неканонические малые РНК инициируют образование вторичных транзитивных виРНК, были проанализированы профили малых РНК в двух 200-нуклеотидных зонах по обе стороны от мишени дцРНК_{pvу}. Анализ не выявил существенных

количеств дополнительных неканонических малых РНК (за исключением единичной 20-нуклеотидной молекулы, вероятно являющейся продуктом деградации РНК PVY) в этих областях (рис. 18А), что свидетельствует об отсутствии транзитивного распространения РНК-интерференции (рис. 18В).

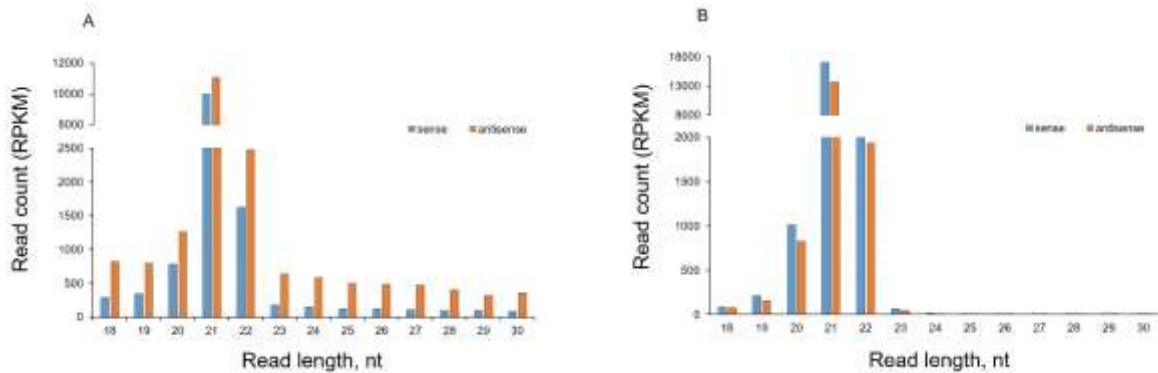


Рисунок 18. Профили размера и полярности PVY-специфичных малых РНК, обнаруженных в листьях растений, инфицированных PVY и обработанных дцРНК_{pvu}. (А) малые РНК, картированные на целевой участок генома PVY (нт 7739–8238), использованный для конструирования дцРНК_{pvu}. (В) малые РНК, картированные без несоответствий на соседние участки длиной по 200 нт выше (нт 7539–7738) и ниже (нт 7939–8138) целевой зоны. Сопоставленные чтения сортировали по размеру (18–30 нт) и полярности (смысловые, антисмысловые) и нормировали в RPKM. Результаты представлены в виде цветочкодированных гистограмм как средние значения четырёх биологических повторов.

В совокупности полученные данные указывают на то, что экзогенно нанесённая дцРНК_{pvu} подвергается расщеплению с образованием фракции неканонических малых РНК различной длины, однако эти малые РНК не индуцируют транзитивную амплификацию и распространение вторичных виРНК за пределы первичного участка мишени. При этом в тот же период в растениях картофеля регистрируется выраженное подавление вирусной инфекции, что, по-видимому, обусловлено активацией процессов РНК-интерференции и/или РТИ, индуцируемых экзогенной дцРНК_{pvu}.

3.4. Генетическое разнообразие изолятов вируса картофеля Y и его использование для оптимизации дизайна PVY -

специфической дцРНК

В целях разработки универсальных препаратов двуцепочечной РНК против вирусов картофеля нами была выполнена многоуровневая оценка генетического разнообразия вирусных популяций растений картофеля. Задачи исследования включали расширенный анализ распространения и молекулярного разнообразия PVY и других вирусов картофеля в 19 регионах Российской Федерации на основе данных высокопроизводительного РНК-секвенирования полевых образцов, а также оптимизацию дизайна PVY-специфической двуцепочечной РНК.

Экспериментальная схема включала закладку полевых опытов с использованием товарного безвирусного семенного картофеля, полученного в тепличных условиях, защищённых от насекомых, и подтверждённого как свободного от PVY и других вирусов методами ОТ-ПЦР. Растения высаживали в открытый грунт без применения инсектицидов, что обеспечивало естественную передачу PVY тлями. Всего было проанализировано 117 образцов листьев и проростков клубней, объединённых по 10–25 растений в каждом образце. На их основе были подготовлены библиотеки РНК-секвенирования, содержащие от 28 до 109 млн парных прочтений. Образцы были собраны на коммерческих полях в регионах Российской Федерации, сгруппированных по федеральным округам (СЗФО, ЦФО, ПФО, СКФО, ЮФО, УрФО, ДВФО).

В исследованных образцах идентифицировано пять вирусов картофеля: PVY, PVM, PVS, PLRV и PVP (рис. 19). Среди выявленных патогенов доминирующее положение занимает вирус картофеля Y, обнаруженный во всех обследованных регионах. Универсальность его распространения указывает на высокую эпидемиологическую значимость данного вируса и подтверждает его способность к адаптации в широком диапазоне климатических и агроэкологических условий. Полученные данные согласуются с результатами ранее проведённых исследований, в которых PVY

также рассматривается как наиболее распространённый вирус картофеля на территории Российской Федерации [142, 143].

Вторым по частоте выявления является вирус картофеля М (PVM), зарегистрированный в Центральном, Южном и Уральском федеральных округах. Широкий, но фрагментированный характер его распространения может быть обусловлен региональными особенностями агротехнологий, сортовым составом посадочного материала и активностью переносчиков.

PVS выявлен в большинстве регионов, где обнаружен PVM, за исключением Тюменской области, что может свидетельствовать о различиях в условиях его циркуляции или ограничениях, связанных с локальными фитосанитарными факторами. Совместная встречаемость PVM и PVS, отмеченная в ряде регионов, указывает на возможную схожесть эпидемиологических механизмов их распространения.

Вирус скручивания листьев картофеля (PLRV) выявлен только в Московской и Новгородской областях, что свидетельствует о его ограниченном распространении в пределах исследуемой выборки. Подобная локализация может быть связана с особенностями экологии переносчиков, а также с эффективностью мер фитосанитарного контроля в других регионах.

Вирус картофеля Р (PVP) обнаружен исключительно в Свердловской области, что указывает на очаговый характер его распространения. Ограниченность ареала данного вируса требует дальнейшего мониторинга с целью оценки потенциальных рисков его расширения.

В образцах, полученных из Камчатского края, вирусы картофеля выявлены не были, что, вероятно, связано с географической изолированностью региона и ограниченным ввозом инфицированного посадочного материала. Кроме того, в ходе исследования не выявлены карантинные вирус картофеля Х и вириод веретеновидности клубней картофеля.

В целом результаты исследования подтверждают выраженную географическую вариабельность распространения вирусных заболеваний картофеля на территории Российской Федерации. При этом вирус картофеля Y демонстрирует наибольшую экологическую пластичность и устойчивость, что определяет его ведущую роль в развитие вирусной инфекции картофеля.

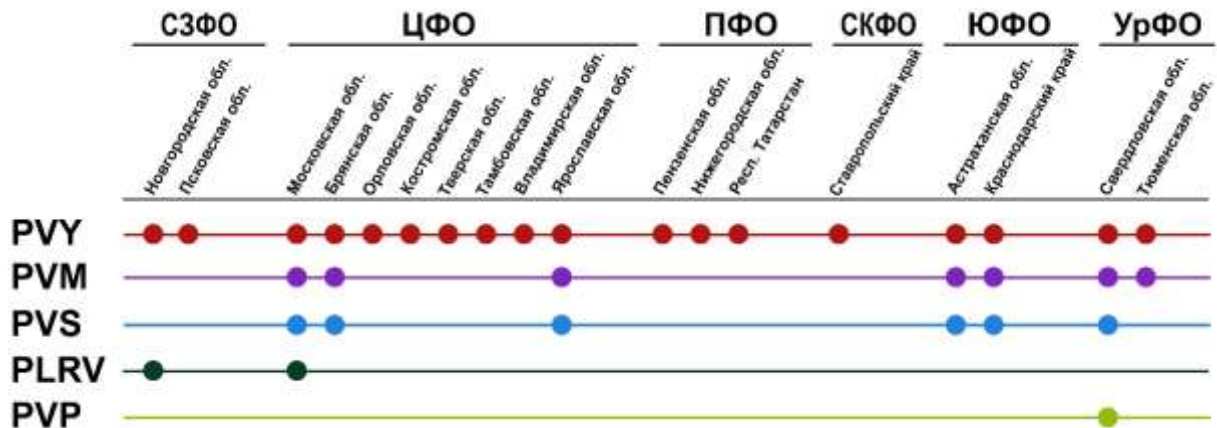


Рисунок 19. География распространения вирусов картофеля в регионах РФ. Регионы РФ сгруппированы по федеральным округам: СЗФО – Северо-Западный, ЦФО – Центральный, ПФО – Приволжский, СКФО – Северо-Кавказский, ЮФО – Южный, УрФО – Уральский. Цветные линии обозначают вирусы: PVY (Potato virus Y), PVM (Potato virus M), PVS (Potato virus S), PLRV (Potato leafroll virus), PVP (Potato virus P). Точки отражают регионы, в которых были обнаружены соответствующие вирусы.

В ходе исследования установлено, что смешанные вирусные инфекции выявлены в 49,6% образцов (56 из 113), что свидетельствует о широком распространении многокомпонентного инфицирования. В составе смешанных инфекций наиболее часто обнаруживался вирус PVM — в 51 из 56 образцов (91%), а также вирус PVY — в 47 образцах (84%). Реже регистрировались вирусы PVS (15 образцов; 27%), PLRV (5 образцов; 9%) и PVP (1 образец; 2%).

Анализ сочетаний вирусов показал, что преобладающей комбинацией в структуре смешанных инфекций являлось сочетание PVM + PVY, выявленное в 35 образцах, что составило около 61% всех случаев смешанного инфицирования. Комбинации PVM + PVS и PVM + PVS + PVY выявлены в 7 и 6 образцах соответственно. Трёхкомпонентное сочетание PLRV + PVM +

PVY зарегистрировано в 4 образцах. Реже встречались сочетания PVS + PVY (2 образца), PVM + PVP + PVY (1 образец) и PLRV + PVY (1 образец). Каждая пятая проба содержала до трёх вирусов. Вирус PVS обнаруживался преимущественно в составе трёхкомпонентных сочетаний.

Доля образцов со смешанными инфекциями варьировала по годам исследования и составила 44,2% в 2021 г. (23 из 52 образцов), 50,0% в 2022 г. (7 из 14), 78,6% в 2023 г. (11 из 14) и 45,5% в 2024 г. (15 из 33). Максимальное значение данного показателя отмечено в 2023 г., при этом объём выборки в указанный период был ограничен.

Оценка различий в доле смешанных инфекций по годам с использованием χ^2 -критерия Пирсона не выявила статистически значимых различий ($\chi^2 = 6,94$; $p = 0,074$). В то же время для наиболее распространённой комбинации вирусов PVM + PVY установлены статистически значимые различия между годами наблюдений ($\chi^2 = 10,06$; $p = 0,018$). Для остальных сочетаний вирусов достоверных различий по годам выявлено не было.

Межрегиональный анализ показал наличие статистически значимых различий в распространённости смешанных инфекций ($\chi^2 = 24,68$; $p < 0,001$). Наибольшая доля образцов со смешанными инфекциями зарегистрирована в Московской (70%) и Свердловской (76%) областях, наименьшая — в Астраханской области (27%) и группе регионов, объединённых в категорию «Прочие» (24%). В категорию «Прочие» включены регионы с числом исследованных образцов менее пяти, что обеспечивало соблюдение условий применимости χ^2 -критерия Пирсона.

Частота выявления комбинации PVM + PVY также достоверно различалась между регионами ($\chi^2 = 26,71$; $p < 0,001$), что указывает на выраженную территориальную неоднородность распространения данной комбинации вирусов.

Распространение и филогенетический анализ вируса картофеля Y

Филогенетический анализ, выполненный на основе 158 полноразмерных контигов вируса картофеля Y, содержащих полную нуклеотидную последовательность полипротеина, а также 165 репрезентативных изолятов из базы данных GenBank, продемонстрировал высокое генетическое разнообразие PVY в исследованных регионах Российской Федерации (рис. 20).

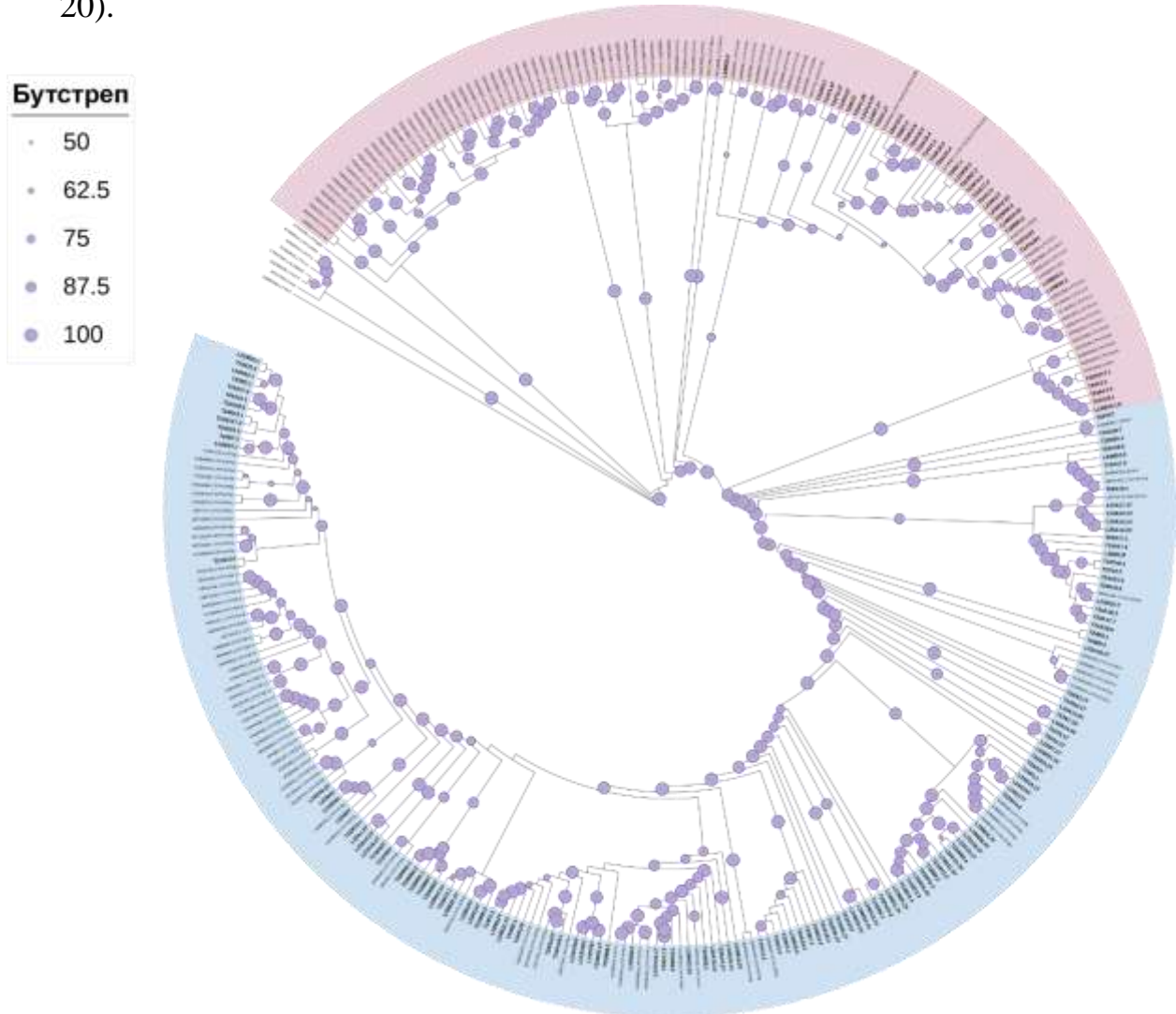


Рисунок 20. Филогенетические взаимосвязи контигов PVY, полученных *de novo* и при референсной сборке на территории РФ, с ранее охарактеризованными изолятами PVY. Филогенетическое дерево построено методом максимального правдоподобия на основе полно кодирующих нуклеотидных последовательностей. Узлы построенного филогенетического дерева аннотированы значениями бутстрэпа для 1000 реплик и визуализированы на ветвях кружками различного размера (от 50–60% для наименьших до 90–100% для наибольших). Для ранее охарактеризованных изолятов показан регистрационный номер GenBank. Голубым цветом выделены кластеры с вариантами

вируса PVY, относящиеся к N-типу, розовым цветом — варианты вируса, принадлежащие к O-типу. Контиги, идентифицированные в настоящей работе, отмечены жирным шрифтом.

Ранее было установлено, что в 2021–2022 гг. в Астраханской и Московской областях в популяции PVY преобладали рекомбинантные варианты NTNa и NTNb, при этом для южного региона было характерно существенно более высокое разнообразие, включающее дополнительные рекомбинантные формы N:O, N-Wi, SYR-I, SYR-II, SYR-III и 261-4. В рамках настоящего исследования география отбора образцов была значительно расширена, что позволило включить ранее полученные данные в обобщённую картину пространственного распределения вариантов PVY на территории Российской Федерации.

Анализ полученных данных показал, что рекомбинантные варианты NTNa и NTNb доминируют практически во всех обследованных регионах. В ряде субъектов Российской Федерации (Псковская, Новгородская, Орловская, Пензенская, Нижегородская, Ставропольская и Тюменская области) были выявлены исключительно изоляты, относящиеся к вариантам NTNa и NTNb. Если ранее основным вариантом PVY в Российской Федерации считался NTNa, то результаты настоящего исследования свидетельствуют о сопоставимой по масштабам распространённости варианта NTNb.

В то же время в отдельных регионах (Костромская и Ярославская области, Республика Татарстан) в анализируемых выборках были обнаружены исключительно изоляты родительского типа Eu-N, что указывает на выраженную региональную неоднородность структуры популяции PVY. Отмечено расширение ареала рекомбинантного варианта N-Wi, который в рамках настоящего исследования был выявлен уже в семи регионах Российской Федерации (рис. 21).

Среди полученных последовательностей идентифицирован изолят, филогенетически родственной редкому рекомбинанту PVY^{ND23}. Анализ изолята T24Ta10, выделенного в Тамбовской области, показал высокую степень нуклеотидного сходства с изолятом KY847997.1 (США, 2017 г.):

уровень идентичности составил 99,36% при 99% покрытии последовательности. Филогенетический анализ подтвердил его кластеризацию с генотипом N:O, характеризующимся смещённой точкой рекомбинации, что свидетельствует о тесной эволюционной связи данных изолятов.

Наибольшее разнообразие рекомбинантных вариантов PVY было зафиксировано в Астраханской и Московской областях. В данных регионах выявлены практически все основные филогенетические клады, включая доминирующие варианты (NTNa, NTNb, N-Wi), а также редкие рекомбинанты (SYR-I, SYR-II, SYR-III, N:O, 261-4). Следует отметить, что для указанных регионов был проанализирован наибольший объём образцов, что могло оказать влияние на выявленный уровень разнообразия.

Описанные нами новые рекомбинантные варианты PVY^{Ast-A-I} и ^{Ast-A-II}, впервые выявленные в Астраханской области, были также обнаружены в образцах 2023–2024 гг [144]. Кроме того, в 2024 г. данные варианты были зафиксированы в Брянской и Владимирской областях, а также в Краснодарском крае, что указывает на их устойчивую циркуляцию и расширение ареала в популяции PVY.

В целом результаты филогенетического анализа свидетельствуют о циркуляции на территории исследованных регионов Российской Федерации двух устойчивых филогенетических линий PVY: доминирующей линии рекомбинантов родительского типа N и более гетерогенной группы, представленной рекомбинантами родительского типа O. Варианты PVY^C, PVY^{O5} и PVY^{NA-N} в ходе исследования выявлены не были. Обнаружение редких рекомбинантных форм (Ast-A-I, Ast-A-II, 261-4, ND23) отражает высокую динамику эволюционных процессов в популяции PVY и, вероятно, связано с интродукцией вируса с инфицированным семенным материалом.

Полученные данные согласуются с результатами ранее опубликованных исследований, указывающих на расширение спектра рекомбинантных вариантов PVY в Российской Федерации в последние годы. В частности,

отмечается увеличение распространённости ранее редких вариантов, включая рекомбинант 261-4, что свидетельствует об активной перестройке популяционной структуры вируса.

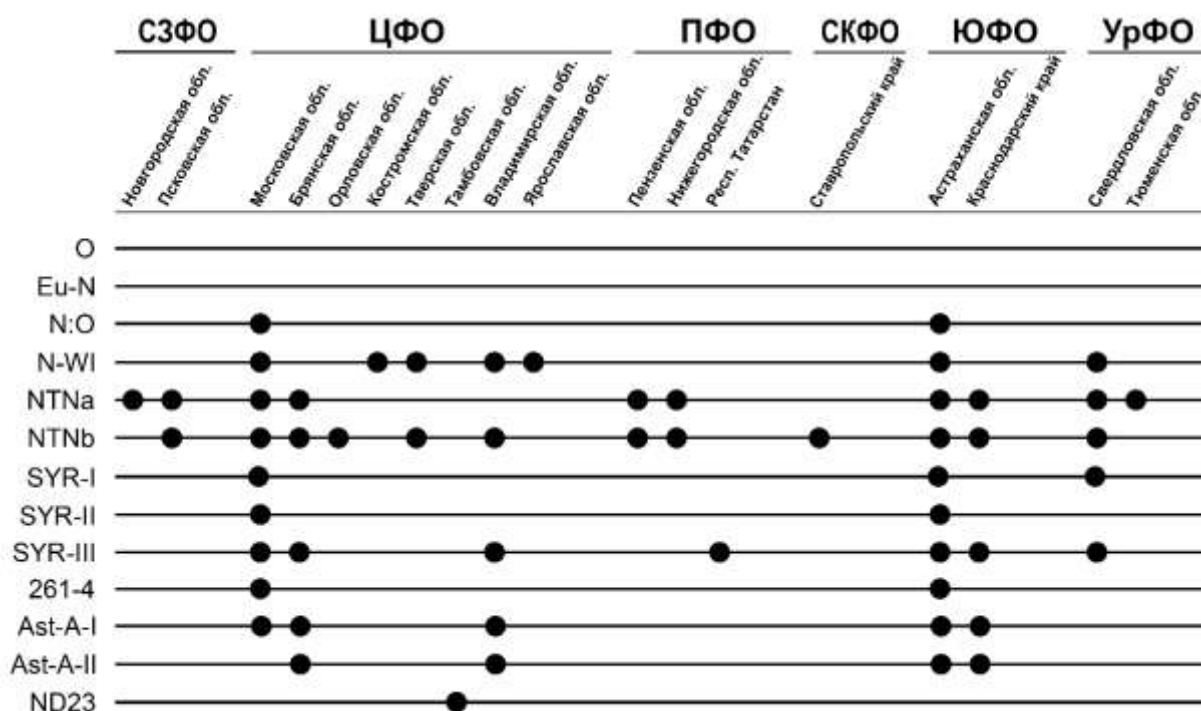


Рисунок 21. Географическое распределение рекомбинантных вариантов PVY, выявленных в регионах РФ. Регионы сгруппированы по федеральным округам (СЗФО – Северо-Западный, ЦФО – Центральный, ПФО – Приволжский, СКФО – Северо-Кавказский, ЮФО – Южный, УрФО – Уральский). Слева даны названия выявленных рекомбинантов PVY. Точки отражают присутствие соответствующего варианта PVY в регионе РФ.

Сравнительный анализ разнообразия популяций PVY с использованием индекса разнообразия Шеннона был выполнен для Астраханской и Московской областей. Данные области были выбраны для расчёта индекса разнообразия Шеннона в связи с наибольшим числом проанализированных образцов, их пространственной и временной репрезентативностью, а также выявленным присутствием как доминирующих, так и редких рекомбинантных вариантов PVY. В результате анализ разнообразия популяций PVY в Астраханской и Московской областях показал, что индекс разнообразия Шеннона был статистически значимо выше в Астраханской области ($H \approx 1,76$) по сравнению с Московской областью ($H \approx 0,86$), несмотря на доминирование изолятов PVY^{NTNa} и PVY^{NTNb} в обоих регионах. Таким образом, для

Астраханской области характерен более широкий спектр рекомбинантных вариантов PVY (рис. 22).

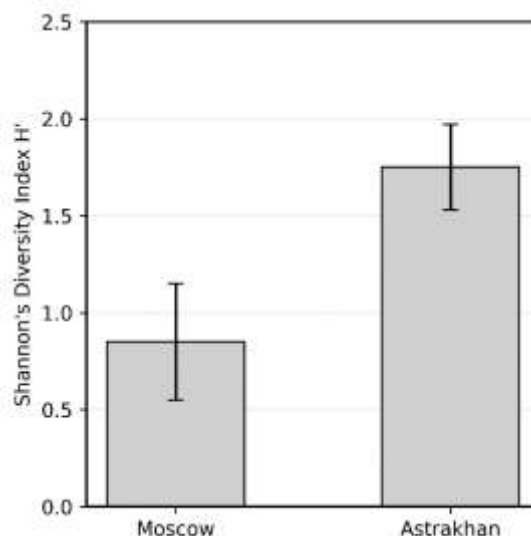


Рисунок 22. Рекомбинантные варианты PVY выявленные в Московской и Астраханской областях России. (а) структуры генома ранее охарактеризованных основных рекомбинантных вариантов PVY. Участки геномов, полученных из PVY^{Eu-N} и PVY^O, показаны темно-синим и оранжевым прямоугольниками соответственно. Приблизительные положения нуклеотидов основных ранее известных точек рекомбинации показаны выше синим цветом. (б) количество контигов, собранных в этом исследовании. (с) распределение богатство изолятов PVY.

Совокупность полученных данных показала, что растения картофеля в полевых условиях, как правило, инфицированы комплексом различных рекомбинантных вариантов PVY, существенно различающихся по структуре генома, включая участки, кодирующие репликазу, на которые была нацелена исходная лабораторная дцРНК_{PVY}. В этой связи при практическом применении такой дцРНК в полевых условиях антивирусный эффект может проявляться преимущественно в отношении доминирующих вариантов вируса, тогда как минорные или редкие рекомбинанты могут частично избегать подавления.

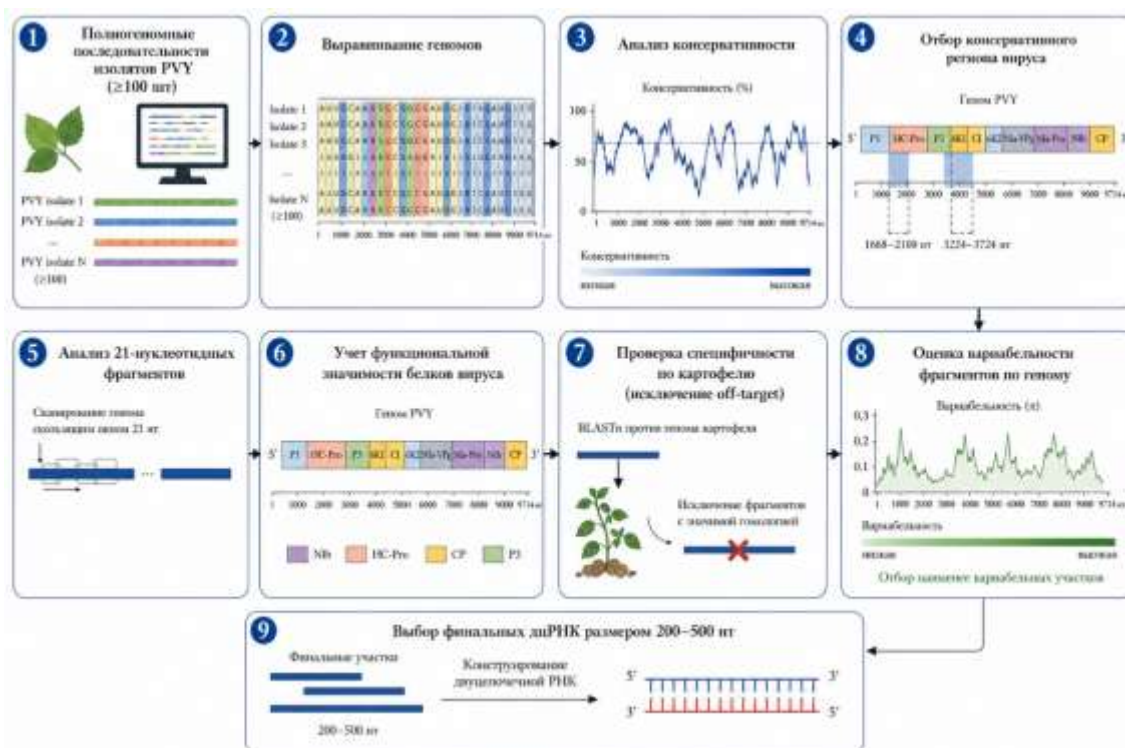


Рисунок 23. Алгоритм отбора участков генома PVY для конструирования двуцепочечных РНК.

При разработке двуцепочечных РНК, направленных на подавление вируса PVY, реализованы ключевые критерии отбора целевых участков генома. В результате анализа полного набора полногеномных последовательностей изолятов PVY выявлены высококонсервативные регионы, содержащие наибольшее число идентичных 21-нуклеотидных фрагментов, потенциально формирующих эффективный пул миРНК. Это обеспечивает возможность воздействия на широкий спектр циркулирующих, включая рекомбинантные, вариантов PVY.

Проведённый анализ специфичности позволил исключить протяжённые гомологии выбранных последовательностей с транскриптами растения-хозяина (*Solanum tuberosum*), что минимизирует риск off-target эффектов.

Дополнительно учтены особенности генетической вариабельности участков в геноме PVY, что позволило выбрать стабильные и консервативные мишени.

На основании этого были предсказаны и синтезированы две дцРНК, нацеленные на области генома PVY, которые являются консервативными для

большинства известных рекомбинантов вируса: дцРНК_{rvu} (1668–2100 нт) и дцРНК_{rvu} (3224–3724 нт) по нумерации референсной последовательности PVY (рис. 23).

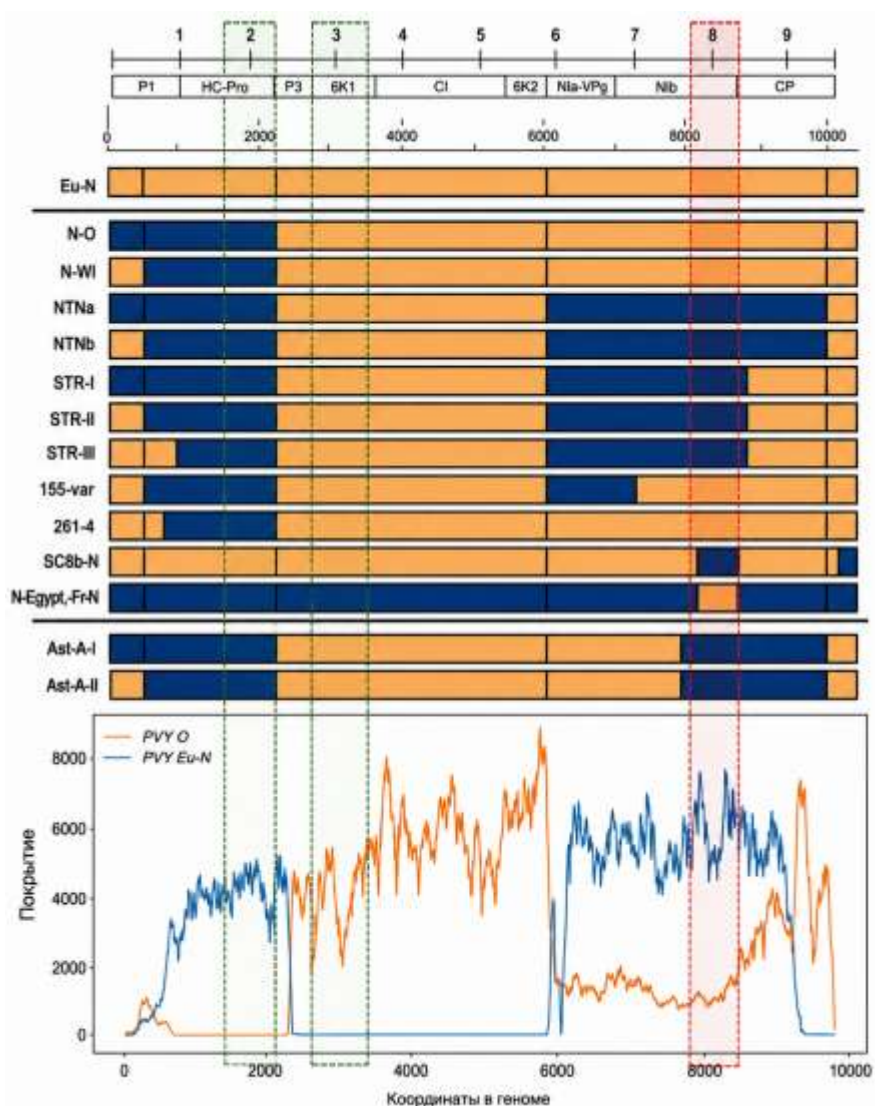


Рисунок 24. Схематическая организация генома PVY и распределение покрытия ридов по координатам генома PVY^O (оранжевый цвет) и PVY^{Eu-N} (синий цвет). Красным цветом обозначен участок, соответствующий дцРНК, использованной в лабораторных экспериментах; зелёным цветом выделены новые дцРНК, разработанные в рамках настоящего исследования.

Таким образом, соблюдение критериев обеспечили обоснованный выбор участков генома PVY для конструирования дцРНК с потенциально широкой и устойчивой противовирусной активностью.

Для оценки влияния конструкций дцРНК, направленных против генов HC-Pro и РЗ вируса картофеля Y, на накопление вируса использовали метод ОТ-ПЦР в реальном времени. Согласно результатам двухфакторного дисперсионного анализа (факторы: тип конструкции и концентрация), статистически значимого влияния исследуемых факторов на уровень накопления вируса выявлено не было ($p > 0,05$). При этом оценка размера эффекта указывала на умеренную тенденцию к снижению вирусной нагрузки в вариантах с применением дцРНК-конструкций. Полученные результаты указывают на целесообразность дальнейшего исследования и оптимизации разработанных конструкций.

Ранее была показана эффективность RNAi-конструкций, направленных против репликазы конкретных штаммов PVY: O и NTN. Однако высокая генетическая вариабельность вируса в природе ограничивает потенциальную универсальность штаммоспецифичных конструкций. В связи с этим в настоящем исследовании были разработаны новые дцРНК-конструкции, направленные против более консервативных участков генома PVY — HC-Pro и РЗ, потенциально обеспечивающих широкий охват различных штаммов вируса.

Отсутствие выраженного противовирусного эффекта может свидетельствовать о том, что консервативность выбранного участка генома не всегда напрямую связана с эффективностью индуцируемого RNAi-ответа. Кроме того, на эффективность экзогенно внесённой дцРНК могут существенно влиять особенности её доставки и стабильности в растительной ткани.

Известно, что эффективность экзогенной дцРНК определяется её устойчивостью к действию нуклеаз, стабильностью в апопласте, эффективностью проникновения в клетки и способностью к системному распространению сигнала сайленсинга [76, 81]. В настоящем исследовании дцРНК применялась без использования специализированных систем доставки

и стабилизации, что могло ограничивать выраженность наблюдаемого эффекта.

Согласно литературным данным [68, 129, 130], использование различных носителей (наночастицы, липосомы, глинистые наноструктуры, полимерные комплексы) позволяет повысить эффективность дцРНК за счёт защиты молекул от деградации и улучшения их доставки в клетки растения.

Таким образом, полученные результаты подтверждают перспективность дальнейшей оптимизации как выбора мишеней, так и систем доставки дцРНК для создания универсальных противовирусных конструкций против PVY.

Заключение

РНК-технологии рассматриваются как перспективное направление создания биопестицидов нового поколения. Экзогенные РНК-препараты обеспечивают высокую селективность действия в отношении целевых организмов, минимальное влияние на нецелевые виды и низкую персистентность в окружающей среде, что делает их эффективной альтернативой химическим средствам защиты растений.

Помимо прикладного значения, экзогенные двуцепочечные РНК являются мощным инструментом функциональной геномики, позволяющим избирательно подавлять экспрессию целевых генов и исследовать механизмы регуляции генетической активности.

Результаты настоящей работы показали, что экзогенное применение вирусспецифической дцРНК в системе «картофель – PVY» обеспечивает многокомпонентную защиту растений. Установлено, что дцРНК не только инициирует РНК-интерференцию, но и активирует механизмы паттерн-индуцированного иммунитета (PTI) и PAR-зависимые сигнальные пути. Выявлены нетипичные популяции малых РНК длиной 18–30 нуклеотидов, что указывает на возможное участие альтернативных путей их биогенеза.

Пути PTI и PAR-метаболизма играют важную роль в ограничении колонизации растений условно-патогенными микроорганизмами и в формировании устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам. Выявленное в работе координированное включение РНКи-механизмов и PTI/PAR-ответов позволяет рассматривать их как элементы единой интегрированной защитной сети. Такая комбинация механизмов обеспечивает более стабильный и потенциально более долговременный уровень противовирусной защиты.

В ходе исследования продемонстрировано эффективное подавление репликации PVY при применении дцРНК_{PVY}. Одновременно выявлены нетипичные по размеру популяции малых РНК, формирующие «лестничный»

профиль длиной от 18 до 30 нуклеотидов. Подобное распределение описывалось ранее [135–138], однако его биологическое значение остаётся дискуссионным. Полученные данные свидетельствуют о том, что формирование «лестничного» профиля в исследуемой системе сопровождается подавлением вирусной инфекции, что указывает на функциональную значимость этих популяций малых РНК. Однако вопрос о механизме противовирусного действия гетерогенных коротких РНК требует дальнейшего изучения.

Важным результатом работы стало получение детализированных данных о генетическом составе популяций PVY, циркулирующих в 19 регионах Российской Федерации, на основе высокопроизводительного секвенирования РНК растений картофеля, естественно заражённых тлями-переносчиками. Наибольшее разнообразие рекомбинантных вариантов PVY выявлено в Астраханской и Московской областях, где обнаружены почти все основные клады, включая доминирующие (NTNa, NTNb, N-Wi) и дополнительные (SYR-I, SYR-II, SYR-III, N:O, 261-4) варианты. Установлено повсеместное распространение исключительно рекомбинантных форм, большинство из которых вызывает некротическую кольцевую болезнь клубней. В 2021–2022 гг. в Астраханской области впервые нами описаны новые рекомбинанты Ast-A-I и Ast-A-II. В 2023–2024 гг. они вновь выявлены в этом регионе, а в 2024 году также обнаружены в Брянской, Владимирской областях и Краснодарском крае, что указывает на их закрепление в популяции PVY.

Интеграция данных о природном разнообразии PVY с результатами лабораторных экспериментов позволила перейти от модельного дизайна дцРНК_{rvu}, эффективного против ограниченного набора штаммов, к разработке универсальных двуцепочечных РНК, нацеленных на консервативные участки генома, общие для основных рекомбинантных вариантов, циркулирующих в российских популяциях. Тем самым продемонстрирована возможность рационального дизайна РНК-препаратов с

расширенным спектром действия на основе анализа популяционной структуры вируса.

В целом полученные результаты подтверждают, что экзогенное применение вирусспецифической дцРНК обеспечивает значимое снижение вирусной нагрузки в растениях картофеля и одновременно активирует несколько уровней защитных реакций — от RNAi до PTI- и PAR-зависимых путей. Данные об особенностях профиля малых РНК и о генетическом разнообразии природных популяций PVY формируют фундаментальную основу для дальнейшей оптимизации РНК-биопрепаратов, их полевых испытаний и интеграции РНК-технологий с традиционными и молекулярно-генетическими методами селекции устойчивых сортов картофеля.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФ № 22-14-00049 и № 23-74-30003.

Выводы

1. Применение экзогенной специфической дцРНК_{rvu} против заражения растений картофеля штаммами PVY^O и PVY^{NTN} приводит к статистически значимому подавлению репликации вирусной РНК ($p < 0,05$). Эффект является специфичным и отсутствует при использовании неспецифической дцРНК_{rvs} против вируса картофеля S, а также в отношении инфекции неродственного вируса картофеля X.
2. Применение экзогенной дцРНК_{rvu} формирует комплексный противовирусный ответ растений картофеля, сочетающий механизмы РНК-интерференции, паттерн-индуцированной и PAR-ассоциированной регуляции иммунитета.
3. Анализ данных высокопроизводительного секвенирования малых РНК показал, что при экзогенном применении дцРНК_{rvu} образуется пул коротких РНК неканонических размеров от 18 до 30 нт. Тогда как при инфекции растений картофеля вирусом картофеля Y генерируются исключительно дискретные виды канонических малых интерферирующих РНК длиной 21 и 22 нт.
4. Выявлено, что эти малые РНК, комплементарные последовательности вирусной РНК, формируются и накапливаются в обработанных дцРНК_{rvu} листьях. Однако системный транспорт коротких РНК и их транзитивная амплификация в растениях картофеля отсутствуют.
5. Исследованы популяции вируса картофеля Y, инфицирующих растения картофеля, которые собраны с полей 19-ти регионов РФ. Установлено повсеместное распространение исключительно рекомбинантных форм вируса, геномы которых включают участки геномов родительских штаммов типов O и Eu-N. Показано распространение новых рекомбинантов Ast-A-I и Ast-A-II, впервые обнаруженных нами в Астраханской области, на другие регионы РФ (Брянская, Владимирская области и Краснодарский край).
6. С учётом установленного разнообразия и структуры популяций вируса

картофеля Y в регионах РФ проведён биоинформатический дизайн вирус-специфической дцРНК. Предсказаны и синтезированы две дцРНК против консервативных участков, универсальных для большинства рекомбинантных геномов вируса, для подавления широкого спектра циркулирующих в РФ вариантов вируса.

Список литературы

1. Devaux A., Kromann P., Ortiz O. Potatoes for sustainable global food security // *Potato Research*. — 2014. — Vol. 57, Iss. 3–4. — P. 185–199.
2. Agrios G.N. *Plant pathology*. — 5th ed. — Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. — 922 p.
3. Thomas-Sharma S., Abdurahman J., Ali A. [et al.] Seed degeneration in potato: the need for an integrated seed health strategy // *Plant Pathology*. — 2016. — Vol. 65, Iss. 1. — P. 3–16.
4. Singh R.P., Valkonen J.P.T., Gray S.M. [et al.] Discussion paper: The naming of Potato virus Y strains infecting potato // *Archives of Virology*. — 2008. — Vol. 153. — P. 1–13.
5. Kenzhebekova R., Pozharskiy A., Adilbayeva K., Gritsenko D. Molecular mechanisms of potato plant–virus–vector interactions // *Plants*. — 2025. — Vol. 14, Iss. 15. — Art. No. 2282.
6. Karasev A.V., Gray S.M. Continuous and emerging challenges of Potato virus Y in potato // *Annual Review of Phytopathology*. — 2013. — Vol. 51. — P. 571–586.
7. Inoue-Nagata A.K., Fiallo-Olivé E., Navas-Castillo J. [et al.] ICTV virus taxonomy profile: Potyviridae // *Journal of General Virology*. — 2022. — Vol. 103, Iss. 5. — Art. No. 001743.
8. Quenouille J., Vassilakos N., Moury B. Potato virus Y: a major crop pathogen that has provided major insights into the evolution of viral pathogenicity // *Molecular Plant Pathology*. — 2013. — Vol. 14, Iss. 5. — P. 439–452.
9. Revers F., García J.A. Molecular biology of potyviruses // *Advances in Virus Research*. — 2015. — Vol. 92. — P. 101–199.
10. Adams M.J., Antoniw J.F., Fauquet C.M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae // *Archives of Virology*. — 2004. — Vol. 150, Iss. 3. — P. 459–479.
11. Valkonen J.P.T. Novel resistance to Potato virus Y in potato // *Theoretical and Applied Genetics*. — 1997. — Vol. 94. — P. 192–197.

- 12.Green K.J., Brown C.J., Karasev A.V. Genetic diversity of Potato virus Y (PVY): Sequence analyses reveal ten novel PVY recombinant structures // *Archives of Virology*. — 2018. — Vol. 163. — P. 23–32.
- 13.Moury H., Arnaud J., Karasev A.V. Evidence for diversifying selection in Potato virus Y and in the coat protein of other potyviruses // *Journal of General Virology*. — 2002. — Vol. 83. — P. 2563–2573.
- 14.Mäkinen K., Hafrén A. Intracellular coordination of potyviral RNA functions in infection // *Frontiers in Plant Science*. — 2014. — Vol. 5.
- 15.Zvereva A.S., Pooggin M.M. Silencing and innate immunity in plant defense against viral and non-viral pathogens // *Viruses*. — 2012. — Vol. 4. — P. 2578–2597.
- 16.Clark M.F., Adams A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses // *Journal of General Virology*. — 1977. — Vol. 34. — P. 475–483.
- 17.Walsh J.A., Barker D.J. Detection of Potato virus Y by RT-PCR // *Journal of Virological Methods*. — 1997. — Vol. 64. — P. 117–127.
- 18.Adams I.P., Glover V., Monger N. [et al.] Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology // *Molecular Plant Pathology*. — 2009. — Vol. 10. — P. 537–545.
- 19.Solomon-Blackburn R.M., Barker H. A review of host major-gene resistance to Potato viruses X, Y, A, and V in potato: Genes, genetics and mapped locations // *Heredity*. — 2001. — Vol. 86. — P. 8–16.
- 20.Dodds P.N., Rathjen J.P. Plant immunity: Towards an integrated view of plant–pathogen interactions // *Nature Reviews Genetics*. — 2010. — Vol. 11, Iss. 8. — P. 539–548.
- 21.Jones J.D.G., Dangl J.L. The plant immune system // *Nature*. — 2006. — Vol. 444, Iss. 7117. — P. 323–329.
- 22.Gallois S., Moury C., German-Retana M. [et al.] Single amino acid changes in the eIF4E translation initiation factor confer resistance to potyviruses // *Journal of Virology*. — 2010. — Vol. 84. — P. 3564–3573.

23. Robaglia C., Caranta C. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection // *Trends in Plant Science*. — 2006. — Vol. 11. — P. 40–45.
24. Andersen E.J. [et al.] Disease resistance mechanisms in plants // *Genes*. — 2018. — Vol. 9, Iss. 7. — Art. No. 339.
25. Couto D., Zipfel C. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants // *Nature Reviews Immunology*. — 2016. — Vol. 16, Iss. 9. — P. 537–552.
26. Li B. [et al.] Transcriptional regulation of pattern-triggered immunity in plants // *Cell Host & Microbe*. — 2016. — Vol. 19, Iss. 5. — P. 641–650.
27. Molina A. [et al.] Arabidopsis cell wall composition determines disease resistance specificity and fitness // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. — 2021. — Vol. 118, Iss. 5. — Art. No. e2010243118.
28. Yamaguchi Y., Huffaker A. Endogenous peptide elicitors in higher plants // *Current Opinion in Plant Biology*. — 2011. — Vol. 14, Iss. 4. — P. 351–357.
29. Bigeard J., Colcombet J., Hirt H. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI) // *Molecular Plant*. — 2015. — Vol. 8, Iss. 4. — P. 521–539.
30. Cui H., Tsuda K., Parker J.E. Effector-triggered immunity: From pathogen perception to robust defense // *Annual Review of Plant Biology*. — 2015. — Vol. 66. — P. 487–511.
31. Takken F.L.W., Govers A. How to build a pathogen detector: Structural basis of NB-LRR function // *Current Opinion in Plant Biology*. — 2012. — Vol. 15. — P. 375–384.
32. Wu C.-H. [et al.] NLR network mediates immunity to diverse plant pathogens // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. — 2017. — Vol. 114, Iss. 30. — P. 8113–8118.
33. Hayashi N. [et al.] Durable panicle blast-resistance gene *Pb1* encodes an atypical CC-NBS-LRR protein and was generated by acquiring a promoter through local genome duplication // *Plant Journal*. — 2010. — Vol. 64. — P. 498–510.
34. Pieterse C.M. [et al.] Networking by small-molecule hormones in plant immunity // *Nature Chemical Biology*. — 2009. — Vol. 5. — P. 308–316.

35. Yuan M., Ngou B.P.M., Ding J. [et al.] Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity // *Nature*. — 2021. — Vol. 592. — P. 105–109.
36. Ngou B.P.M., Ahn H., Ding P. [et al.] Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors // *Nature*. — 2021. — Vol. 592. — P. 110–115.
37. Pruitt R.N., Gust A.A., Nürnberger T. Plant immunity unified // *Nature Plants*. — 2021. — Vol. 7, Iss. 4. — P. 382–383.
38. Tsuda K., Somssich I.E. Transcriptional networks in plant immunity // *New Phytologist*. — 2015. — Vol. 206. — P. 932–947.
39. Tada Y. [et al.] Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins // *Science*. — 2008. — Vol. 321. — P. 952–956.
40. Coppola M. [et al.] Plant-to-plant communication triggered by systemin primes anti-herbivore resistance in tomato // *Scientific Reports*. — 2017. — Vol. 7. — Art. No. 15522.
41. Boller T., Felix G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors // *Annual Review of Plant Biology*. — 2009. — Vol. 60. — P. 379–406.
42. Ding S.-W. RNA-based antiviral immunity // *Nature Reviews Immunology*. — 2010. — Vol. 10. — P. 632–644.
43. Baulcombe D. RNA silencing // *Trends in Biochemical Sciences*. — 2005. — Vol. 30. — P. 290–293.
44. Fire A. [et al.] Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // *Nature*. — 1998. — Vol. 391. — P. 806–811.
45. Ecker J.R., Davis R.W. Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. — 1986. — Vol. 83. — P. 5372–5376.
46. Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans // *Plant Cell*. — 1990. — Vol. 2. — P. 279–289.

47. Van Blokland R. [et al.] Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover // *Plant Journal*. — 1994. — Vol. 6. — P. 861–877.
48. Li F., Ding S.-W. Virus counterdefense: Diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity // *Annual Review of Microbiology*. — 2006. — Vol. 60. — P. 503–531
49. Carthew R.W., Sontheimer E.J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs // *Cell*. — 2009. — Vol. 136. — P. 642–655.
50. Zhang B. [et al.] Roles of small RNAs in virus-plant interactions // *Viruses*. — 2019. — Vol. 11. — Art. No. 827.
51. Csorba T., Kontra L., Burgyán J. Viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host–pathogen coexistence // *Virology*. — 2015. — Vol. 479–480. — P. 85–103.
52. Amari K., Niehl A. Nucleic acid-mediated PAMP-triggered immunity in plants // *Current Opinion in Virology*. — 2020. — Vol. 42. — P. 32–39.
53. Mlotshwa S. [et al.] DICER-LIKE2 plays a primary role in transitive silencing of transgenes in *Arabidopsis* // *PLoS ONE*. — 2008. — Vol. 3. — Art. No. e1755.
54. Aregger M., Borah M., Seguin M. [et al.] Primary and secondary siRNAs in geminivirus-induced gene silencing // *PLoS Pathogens*. — 2012. — Vol. 8. — Art. No. e1002941.
55. Taliansky M. [et al.] RNA-based technologies for engineering plant virus resistance // *Plants*. — 2021. — Vol. 10, Iss. 1. — Art. No. 82.
56. Yang Z., Li Y. Dissection of RNAi-based antiviral immunity in plants // *Current Opinion in Virology*. — 2018. — Vol. 32. — P. 88–99.
57. Djami-Tchatchou A.T. [et al.] Functional roles of microRNAs in agronomically important plants — potential as targets for crop improvement and protection // *Frontiers in Plant Science*. — 2017. — Vol. 8. — Art. No. 378.
58. Guo Y. [et al.] Integrated analysis of tobacco miRNA and mRNA expression profiles under PVY infection provides insight into tobacco-PVY interactions // *Scientific Reports*. — 2017. — Vol. 7. — Art. No. 4895.

59. Wu J. [et al.] Viral-inducible Argonaute18 confers broad-spectrum virus resistance in rice by sequestering a host microRNA // *eLife*. — 2015. — Vol. 4. — Art. No. e05733.
60. Wang H. [et al.] A signaling cascade from miR444 to RDR1 in rice antiviral RNA silencing pathway // *Plant Physiology*. — 2016. — Vol. 170. — P. 2365–2377.
61. Wu J. [et al.] ROS accumulation and antiviral defence control by microRNA528 in rice // *Nature Plants*. — 2017. — Vol. 3. — Art. No. 16203.
62. Du Z. [et al.] Using a viral vector to reveal the role of MicroRNA159 in disease symptom induction by a severe strain of Cucumber mosaic virus // *Plant Physiology*. — 2014. — Vol. 164. — P. 1378–1388.
63. Qi Y., Denli A.M., Hannon G.J. Biochemical specialization within Arabidopsis RNA silencing pathways // *Molecular Cell*. — 2005. — Vol. 19. — P. 421–428.
64. Zhang P., Li S., Chen M. Characterization and function of circular RNAs in plants // *Frontiers in Molecular Biosciences*. — 2020. — Vol. 7. — Art. No. 91.
65. Jouannet V., Maizel A. Trans-acting small interfering RNAs: Biogenesis, mode of action, and role in plant development // *MicroRNAs in Plant Development and Stress Responses* / ed. by R. Sunkar. — Berlin ; Heidelberg : Springer, 2012. — Vol. 15.
66. Wang J. [et al.] Re-analysis of long non-coding RNAs and prediction of circRNAs reveal their novel roles in susceptible tomato following TYLCV infection // *BMC Plant Biology*. — 2018. — Vol. 18. — Art. No. 104.
67. Niehl A. [et al.] Double-stranded RNAs induce a pattern-triggered immune signaling pathway in plants // *New Phytologist*. — 2016. — Vol. 211. — P. 1008–1019.
68. Mitter N. [et al.] Induction of virus resistance by exogenous application of double-stranded RNA // *Current Opinion in Virology*. — 2017. — Vol. 26. — P. 49–55.
69. Tenllado F. [et al.] Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection // *Journal of Virology*. — 2001. — Vol. 75. — P. 12288–12297.
70. Koonin E.V., Makarova K.S., Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems // *Current Opinion in Microbiology*. — 2017. — Vol. 37. — P. 67–78.

71. Kalinina N.O. [et al.] CRISPR applications in plant virology: Virus resistance and beyond // *Phytopathology*. — 2020. — Vol. 110. — P. 18–28.
72. Cao Y. [et al.] Control of plant viruses by CRISPR/Cas system-mediated adaptive immunity // *Frontiers in Microbiology*. — 2020. — Vol. 11. — Art. No. 593700.
73. Price A.A. [et al.] Cas9-mediated targeting of viral RNA in eukaryotic cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. — 2015. — Vol. 112. — P. 6164–6169.
74. Abel P.P. [et al.] Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene // *Science*. — 1986. — Vol. 232. — P. 738–743.
75. Baulcombe D.C. The role of viruses in identifying and analyzing RNA silencing // *Annual Review of Virology*. — 2022. — Vol. 9. — P. 353–373.
76. Morozov S.Y. [et al.] Double-stranded RNAs in plant protection against pathogenic organisms and viruses in agriculture // *Acta Naturae*. — 2019. — Vol. 11. — P. 13–21.
77. Khalid A. [et al.] Small RNA-based genetic engineering for plant viral resistance: Application in crop protection // *Frontiers in Microbiology*. — 2017. — Vol. 8. — Art. No. 43.
78. Taning C.N.T. [et al.] RNA-based biocontrol compounds: Current status and perspectives to reach the market // *Pest Management Science*. — 2020. — Vol. 76. — P. 841–845.
79. Sun Z.-N. [et al.] Bacterially expressed double-stranded RNAs against hot-spot sequences of Tobacco mosaic virus or Potato virus Y genome have different ability to protect tobacco from viral infection // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. — 2010. — Vol. 162. — P. 1901–1914.
80. Guan R., Miao X., Li H. Bacteria-based double-stranded RNA production to develop cost-effective RNA interference application for insect pest management // *Methods in Molecular Biology*. — 2024. — Vol. 2771. — P. 73–81.

81. He L., Huang Y., Tang X. RNAi-based pest control: Production, application and the fate of dsRNA // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. — 2022. — Vol. 10. — Art. No. 1080576.
82. Tenllado F. [et al.] Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections // *BMC Biotechnology*. — 2003. — Vol. 3. — Art. No. 3.
83. Carbonell A. [et al.] Double-stranded RNA interferes in a sequence-specific manner with the infection of representative members of the two viroid families // *Virology*. — 2008. — Vol. 371. — P. 44–53.
84. Sun Z.-N. [et al.] HpRNAs derived from different regions of the NIB gene have different abilities to protect tobacco from infection with Potato virus Y // *Journal of Phytopathology*. — 2009. — Vol. 158. — P. 566–568.
85. Konakalla N.C. [et al.] Exogenous application of double-stranded RNA molecules from TMV p126 and CP genes confers resistance against TMV in tobacco // *Planta*. — 2016. — Vol. 244. — P. 961–969.
86. Frascati F. [et al.] Exogenous application of dsRNA for protection against Tomato leaf curl New Delhi virus // *Viruses*. — 2024. — Vol. 16, Iss. 3. — Art. No. 436.
87. Rahenbrock D., Bode M., Varrelmann M. Differential effects of local dsRNA application on systemic Beet mosaic virus resistance in *Nicotiana benthamiana* and *Beta vulgaris* // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2025. — Vol. 38, Iss. 4. — P. 518–528.
88. Wang Y. [et al.] Exogenous application of IR-specific dsRNA inhibits infection of Cucumber green mottle mosaic virus in watermelon // *Agronomy*. — 2025. — Vol. 15. — Art. No. 2332.
89. Priyanka V.H., Akhter Y., Sangeeta S. Topical application of conserved dsRNA confers sustainable broad-spectrum resistance against leaf curl disease causing begomoviruses in crops // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. — 2025. — Vol. 139. — Art. No. 102766.
90. Sanfaçon H. Plant translation factors and virus resistance // *Viruses*. — 2015. — Vol. 7. — P. 3392–3419.

91. Wang X. [et al.] Silencing of the host factor eIF(iso)4E gene confers Plum pox virus resistance in plum // PLoS ONE. — 2013. — Vol. 8. — Art. No. e50627.
92. Shaw J. [et al.] Coilin, the signature protein of Cajal bodies, differentially modulates the interactions of plants with viruses in widely different taxa // Nucleus. — 2014. — Vol. 5. — P. 85–94.
93. Saha D., Dey P. New dimensions of RNA-based technologies in plant functional genomics // Indian Journal of Natural Sciences. — 2020. — Vol. 10. — P. 23286–23294.
94. Carbonell A., Cisneros A.E. Artificial small RNA-based silencing tools for antiviral resistance in plants // Plants. — 2020. — Vol. 9, Iss. 6. — Art. No. 669.
95. Zhou L., Yuan Q., Ai X., Chen J., Lu Y., Yan F. Transgenic rice plants expressing artificial miRNA targeting the Rice stripe virus MP gene are highly resistant to the virus // Biology. — 2022. — Vol. 11, Iss. 2. — Art. No. 332.
96. Carbonell A., Rubio C., Daròs J.A. Multi-targeting of viral RNAs with synthetic trans-acting small interfering RNAs enhances plant antiviral resistance // Plant Journal. — 2019. — Vol. 100. — P. 720–737.
97. Samarskaya V.O. [et al.] Impact of exogenous application of Potato virus Y-specific dsRNA on RNA interference, pattern-triggered immunity and poly(ADP-ribose) metabolism // International Journal of Molecular Sciences. — 2022. — Vol. 23, Iss. 14. — Art. No. 7915.
98. Nicot N., Hausman J.-F., Hoffmann L., Evers D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress // Journal of Experimental Botany. — 2005. — Vol. 56. — P. 2907–2914.
99. Baebler Š. [et al.] Dynamics of responses in compatible potato—Potato virus Y interaction are modulated by salicylic acid // PLoS ONE. — 2011. — Vol. 6. — Art. No. e29009.
100. Makarova S., Makhotenko A., Spechenkova N., Love A.J., Kalinina N.O., Taliansky M. Interactive responses of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants to heat stress and infection with Potato virus Y // Frontiers in Microbiology. — 2018. — Vol. 9. — Art. No. 2582.

101. Du Z., Chen J., Hiruki C. Optimization and application of a multiplex RT-PCR system for simultaneous detection of five potato viruses using 18S rRNA as an internal control // *Plant Disease*. — 2006. — Vol. 90. — P. 185–189.
102. Lacaze A., Joly D.L. Structural specificity in plant–filamentous pathogen interactions // *Molecular Plant Pathology*. — 2020. — Vol. 21. — P. 1513–1525.
103. Baebler Š. [et al.] Dynamics of responses in compatible potato–Potato virus Y interaction are modulated by salicylic acid // *PLoS ONE*. — 2011. — Vol. 6. — Art. No. e29009.
104. Pajerowska K.M., Parker J.E., Gebhardt C. Potato homologs of *Arabidopsis thaliana* genes functional in defense signaling: Identification, genetic mapping, and molecular cloning // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2005. — Vol. 18. — P. 1107–1119.
105. Nietzschmann L. [et al.] Early Pep-13-induced immune responses are SERK3A/B-dependent in potato // *Scientific Reports*. — 2019. — Vol. 9. — Art. No. 18380.
106. Glushkevich A. [et al.] Transcriptomic reprogramming, alternative splicing and RNA methylation in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants in response to Potato virus Y infection // *Plants*. — 2022. — Vol. 11. — Art. No. 635.
107. Naveed K., Mitter N., Harper A., Dhingra A., Pappu H.R. Comparative analysis of virus-specific small RNA profiles of three biologically distinct strains of Potato virus Y in infected potato (*Solanum tuberosum*) cv. Russet Burbank // *Virus Research*. — 2014. — Vol. 191. — P. 153–160.
108. Ahn S.-J. [et al.] Microbial-based double-stranded RNA production to develop cost-effective RNA interference application for insect pest management // *International Journal of Insect Science*. — 2019. — Vol. 11. — Art. No. 1179543319840323.
109. Taliansky M. [et al.] Escape of a plant virus from amplicon-mediated RNA silencing is associated with biotic or abiotic stress // *Plant Journal*. — 2004. — Vol. 39. — P. 194–205.

110. Hauck P., Thilmony R., He S.Y. A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. — 2003. — Vol. 100. — P. 8577–8582.
111. De Block M., Verduyn C., De Brouwer D., Cornelissen M. Poly(ADP-ribose) polymerase in plants affects energy homeostasis, cell death and stress tolerance // *Plant Journal*. — 2005. — Vol. 41. — P. 95–106.
112. Affar E.B. [et al.] Immunological determination and size characterization of poly(ADP-ribose) synthesized in vitro and in vivo // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 1999. — Vol. 1428. — P. 137–146.
113. Andrews S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. — URL: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (дата обращения: 18.09.2023).
114. Shen W., Le S., Li Y., Hu F. SeqKit: A cross-platform and ultrafast toolkit for FASTA/Q file manipulation // *PLoS ONE*. — 2016. — Vol. 11, Iss. 10. — Art. No. e0163962.
115. Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M., Levin J.Z., Thompson D.A., Amit I., Adiconis X., Fan L., Raychowdhury R., Zeng Q. [et al.] Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome // *Nature Biotechnology*. — 2011. — Vol. 29. — P. 644–652.
116. Bushmanova E. [et al.] rnaSPAdes: A de novo transcriptome assembler and its application to RNA-Seq data // *GigaScience*. — 2019. — Vol. 8. — Art. No. giz100.
117. Gurevich A. [et al.] QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies // *Bioinformatics*. — 2013. — Vol. 29, Iss. 8. — P. 1072–1075.
118. Van Rossum G., Drake F.L. Python 3 documentation. — URL: <https://docs.python.org/3/> (дата обращения: 18.09.2023).
119. Kim D., Paggi J.M., Park C., Bennett C., Salzberg S.L. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype // *Nature Biotechnology*. — 2019. — Vol. 37. — P. 907–915.

120. Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools // *Bioinformatics*. — 2009. — Vol. 25, Iss. 16. — P. 2078–2079.
121. Milne I., Stephen G., Bayer M., Cock P.J.A., Pritchard L., Cardle L., Shaw P.D., Marshall D. Tablet: Visualizing next-generation sequence assemblies and mappings // *Methods in Molecular Biology*. — 2016. — Vol. 1374. — P. 253–268.
122. Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J. [et al.] Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega // *Molecular Systems Biology*. — 2011. — Vol. 7. — Art. No. 539.
123. Edgar R.C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // *Nucleic Acids Research*. — 2004. — Vol. 32, Iss. 5. — P. 1792–1797.
124. Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis // *Molecular Biology and Evolution*. — 2000. — Vol. 17, Iss. 4. — P. 540–552.
125. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // *Molecular Biology and Evolution*. — 2018. — Vol. 35, Iss. 6. — P. 1547–1549.
126. Letunic I., Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation // *Nucleic Acids Research*. — 2021. — Vol. 49, Iss. W1. — P. W293–W296.
127. Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // *Nature Methods*. — 2012. — Vol. 9, Iss. 4. — P. 357–359.
128. Delgado-Martín J., Velasco L., Janssen D. Exogenous application of dsRNA for the control of viruses in cucurbits // *Frontiers in Plant Science*. — 2022. — Vol. 13. — Art. No. 895953.
129. Rego-Machado C.M. [et al.] siRNA biogenesis and advances in topically applied dsRNA for controlling virus infections in tomato plants // *Scientific Reports*. — 2020. — Vol. 10. — Art. No. 22277.

130. Mitter N. [et al.] Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses // *Nature Plants*. — 2017. — Vol. 3. — Art. No. 16207.
131. Cheng X., Wang A. Multifaceted defense and counter-defense in co-evolutionary arms race between plants and viruses // *Communicative & Integrative Biology*. — 2017. — Vol. 10. — P. 508–525.
132. Love A.J. [et al.] Cauliflower mosaic virus protein P6 inhibits signaling responses to salicylic acid and regulates innate immunity // *PLoS ONE*. — 2012. — Vol. 7. — Art. No. e47535.
133. Gibson B.A., Kraus W.L. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. — 2012. — Vol. 13. — P. 411–424.
134. Briggs A.G., Bent A.F. Poly(ADP-ribosyl)ation in plants // *Trends in Plant Science*. — 2011. — Vol. 16. — P. 372–380.
135. Feng B. [et al.] Protein poly(ADP-ribosyl)ation regulates Arabidopsis immune gene expression and defense responses // *PLoS Genetics*. — 2015. — Vol. 11. — Art. No. e1004936.
136. Sekine K.-T. [et al.] High level expression of a virus resistance gene, RCY1, confers extreme resistance to Cucumber mosaic virus in *Arabidopsis thaliana* // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2008. — Vol. 21. — P. 1398–1407.
137. Adams-Phillips L., Briggs A.G., Bent A.F. Disruption of poly(ADP-ribosyl)ation mechanisms alters responses of Arabidopsis to biotic stress // *Plant Physiology*. — 2010. — Vol. 152. — P. 267–280.
138. Jin L., Chen M., Xiang M., Guo Z. RNAi-based antiviral innate immunity in plants // *Viruses*. — 2022. — Vol. 14. — Art. No. 432.
139. Schröder J.A., Jullien P.E. The diversity of plant small RNAs silencing mechanisms // *CHIMIA*. — 2019. — Vol. 73. — P. 362.
140. Alexandrova A. [et al.] Virus elimination from naturally infected field cultivars of potato (*Solanum tuberosum*) by transgenic RNA interference // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2022. — Vol. 23. — Art. No. 8020.

141. Fang X., Qi Y. RNAi in plants: An Argonaute-centered view // *Plant Cell*. — 2016. — Vol. 28. — P. 272–285.
142. Yanagisawa H., Matsushita Y., Khiutti A., Mironenko N., Ohto Y., Afanasenko O. Occurrence and distribution of viruses infecting potato in Russia // *Letters in Applied Microbiology*. — 2021. — Vol. 73, Iss. 1. — P. 64–72.
143. Malko A. [et al.] Potato pathogens in Russia's regions: An instrumental survey with the use of real-time PCR/RT-PCR in matrix format // *Pathogens*. — 2019. — Vol. 8, Iss. 1. — Art. No. 18.
144. Samarskaya V. [et al.] Identification of two novel recombinant types of Potato virus Y from *Solanum tuberosum* plants in the southern region of Russia // *Plant Disease*. — 2025. — Vol. 109, Iss. 5. — P. 998–1003.