

На правах рукописи

Самарская Виктория Олеговна

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

1.5.6 Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в отделе молекулярной биологии и биотехнологии растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН).

Научный руководитель:

Тальянский Михаил Эммануилович, доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Митрофанова Ирина Вячеславовна, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, доцент, главный научный сотрудник, заведующая научно-исследовательским отделом экспериментальной биологии и патологии растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук».

Джавахия Виталий Георгиевич, кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, заведующий отделом молекулярной биологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии РАН".

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Защита диссертации состоится «09» декабря 2026 года в 11:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117437, г. Москва, вн. тер. г. Муниципальный округ Коньково, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, к. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНЦ ИБХ РАН и на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2026 г.

**Ученый секретарь
Диссертационного совета**



д.ф.-м.н. В.А. Олейников

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Вirus картофеля Y (Potato virus Y, PVY) является одним из наиболее распространённых и экономически значимых фитопатогенов картофеля. Инфекция PVY приводит к существенным потерям урожая, 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.

Цель исследования

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.

Научная новизна и практическая значимость исследования

В работе получены новые данные о влиянии экзогенной вирусспецифической дцРНК на развитие инфекции PVY и формирование противовирусной устойчивости растений картофеля. Показано, что экзогенная PVY-специфичная дцРНК способна одновременно инициировать вирус-специфическую РНК-интерференцию и активировать компоненты паттерн-индуцированного иммунитета растений (PTI). Высокопроизводительное секвенирование малых РНК выявило неканоническое распределение вирусспецифичных малых РНК, что указывает на возможное участие альтернативных путей биогенеза малых РНК в ответе картофеля на инфекцию PVY. На основе высокопроизводительного секвенирования проведён анализ генетического разнообразия популяций PVY в РФ. Исследование охватило 14 сортов картофеля из 19 регионов РФ, что позволило выявить особенности распределения и соотношения штаммов вируса в различных климатических зонах. Полученные результаты расширяют представления о механизмах устойчивости растений, индуцированных экзогенной обработкой дцРНК, и имеют прикладное значение для разработки экологически безопасных противовирусных препаратов на основе дцРНК для защиты с/х растений от вирусных инфекций с целью снижения применения химических пестицидов и ГМО-технологий.

Методология и методы исследования

Проведен анализ литературных данных по теме исследования. Работа выполнена с применением комплексного подхода, объединяющего методы молекулярной биологии, вирусологии, геномики и биоинформатического анализа. Наличие и накопление вируса определяли методами молекулярной диагностики, включая ПЦР в реальном времени. Для исследования профиля малых РНК применяли высокопроизводительное секвенирование (NGS) с последующим биоинформатическим анализом популяций малых РНК. Анализ генетического разнообразия вариантов PVY проводили на основе секвенирования РНК (RNA-seq) растений картофеля, собранных в различных регионах РФ, с последующей филогенетической и сравнительно-геномной обработкой данных.

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 (PTI) 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 варибельности 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.

Степень достоверности и апробация результатов работы

Результаты работы апробированы на семинаре отдела молекулярной биологии и биотехнологии растений. Материалы диссертационной работы были опубликованы в 6 статьях в рецензируемых научных изданиях, и представлены на четырех международных и на двух всероссийских конференциях. Достоверность результатов работы подтверждается статистическим анализом данных и наличием биологических повторов.

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.

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.

Основное содержание работы

1. Влияние экзогенной PVY-специфической дцРНК на накопление вируса картофеля Y в растениях *S. tuberosum*

Способность экзогенно наносимой дцРНК индуцировать защиту от PVY оценивали на растениях *Solanum tuberosum* сорта Индиго с использованием дцРНК, продуцируемой в бактериальной системе *Escherichia coli*. PVY-специфическая дцРНК (дцРНК_{pvу}) длиной 910 и 504 пар нуклеотидов была гомологична 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, специфичной к неродственному вирусу картофеля S — дцРНК_{pvs}) (рис. 1). Однако со временем подавляющий эффект дцРНК_{pvу} уменьшался: к 14 дню после инфицирования (дпи) степень ингибирования вирусной репликации снижалась, а к 19 дпи практически исчезала, что приводило к накоплению вируса на уровне, сопоставимом с контролем (рис. 1). В контрольных вариантах, где растения обрабатывали буфером или неспецифической дцРНК_{pvs} защитного эффекта по отношению к инфекции PVY не отмечалось (рис. 1).

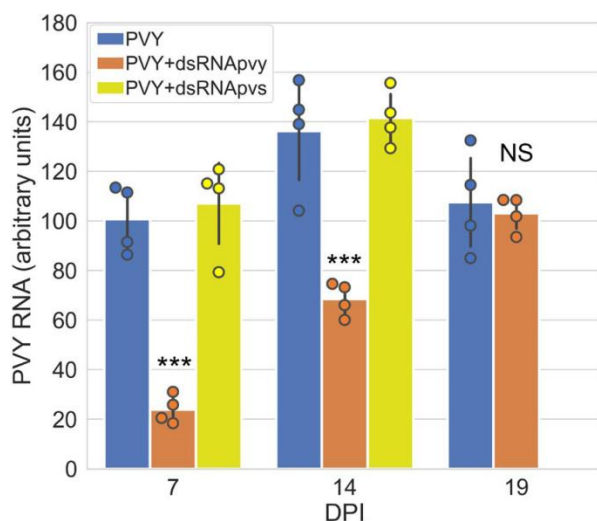


Рисунок 1. Уровни накопления РНК PVY в системно инфицированных листьях растений картофеля сорта Индиго в течение 7–19 дни. Уровни экспрессии РНК PVY были нормализованы к уровням внутреннего контроля, *StEF-1α* и *StCox*. Статистический анализ проводили на четырех независимых биологических повторах. Данные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

В следующем эксперименте дцРНК наносили еженедельно, что обусловило устойчивое подавление экспрессии вирусной РНК, сохранявшееся до 14 и 21 дни по сравнению с контролем (растения, обработанные буфером) (рис. 2А). Специфичность защитного эффекта дцРНКру оценивали по реакции растений, инфицированных вирусом картофеля Х (PVX). В отличие от вариантов с инфекцией PVY (рис. 2А), при инокуляции PVX после обработки дцРНКру защитный эффект не наблюдался (рис. 2В).

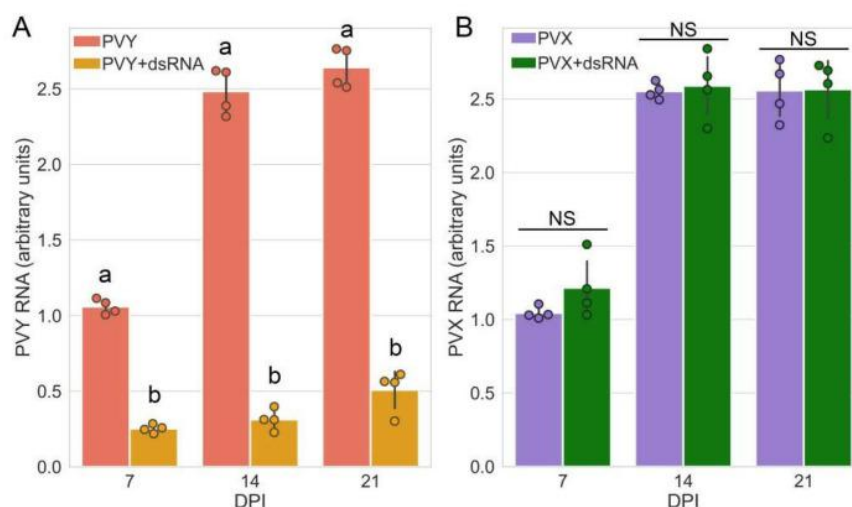


Рисунок 2. Уровни накопления РНК PVY (А) и РНК PVX (В) в системно инфицированных листьях растений картофеля сорта Индиго на 7, 14 и 21 дни. Уровни экспрессии РНК PVY и РНК PVX были нормализованы до уровня внутреннего контроля, *StEF-1α* и *StCox*. Статистический анализ проводили на четырех независимых биологических повторах. Данные средние ± 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 (а, б) 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}, которая определяется её нуклеотидной последовательностью, и согласуются с литературными данными.

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

Анализ низкомолекулярных РНК методом нозерн-блоттинга в образцах из растений, инфицированных вирусом картофеля Y, подтвердил образование вирусспецифических малых интерферирующих РНК (миРНК) при инфекции PVY. При этом растения, обработанные дцРНК_{pvu} и инфицированные PVY, демонстрировали повышенное накопление миРНК (рис. 3).

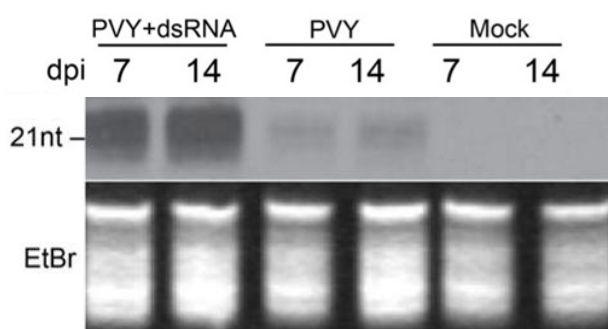


Рисунок 3. Образование PVY-специфических миРНК, индуцированное экзогенным применением дцРНК_{pvu} (PVY⁰) через 7 и 14 дней после обработки. В качестве контроля использовали незаражённые растения и растения,

инфицированные PVY⁰ 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 (рис. 2А) и подтверждает участие механизма РНК-интерференции в опосредованной дцРНК защите от PVY. Анализ покрытия генома PVY показал, что в библиотеках, полученных как из инокулированных, так и из неинокулированных (системных) листьев, инфицированных PVY растений, прочтения были относительно равномерно распределены по всему геному PVY (рис. 4). В образцах растений, обработанных только дцРНК_{pvu} (на 7 dpi), регистрировались прочтения РНК, соответствующие исключительно участку генома PVY, использованному для дизайна и синтеза дцРНК (рис. 4А). 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.

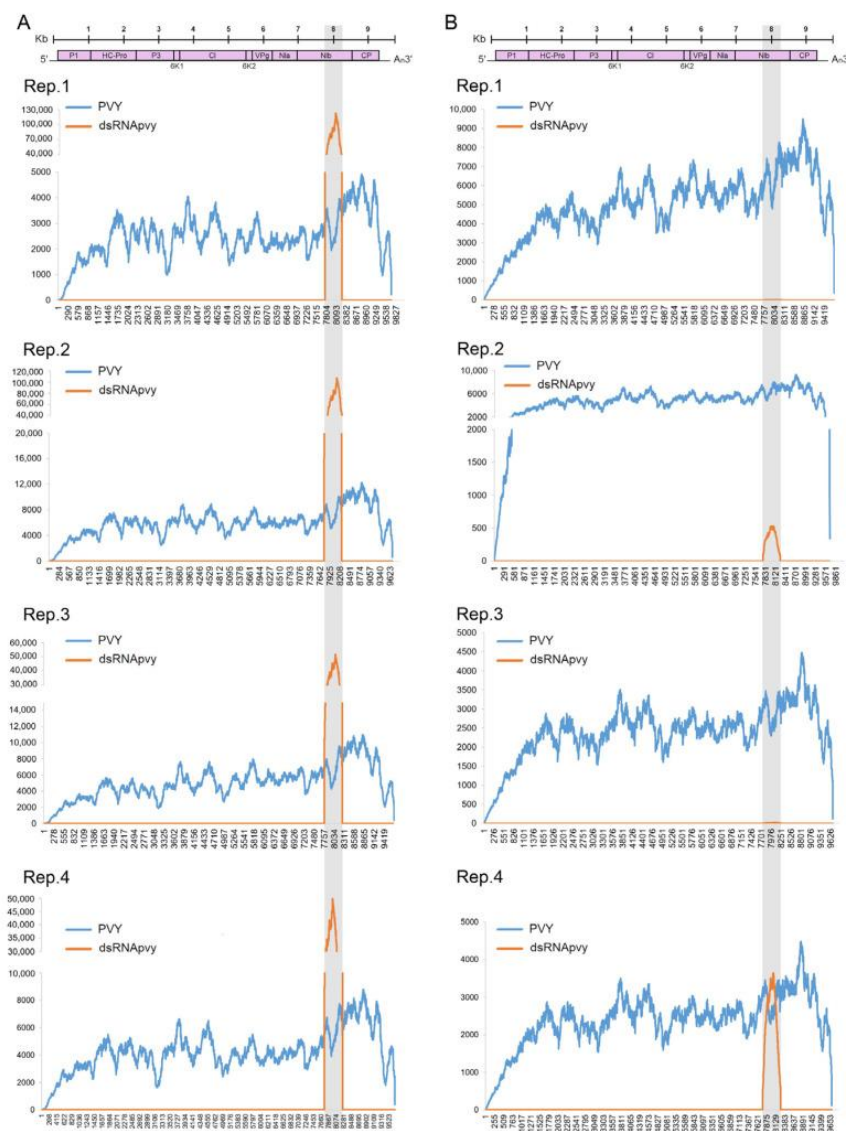


Рисунок 4.

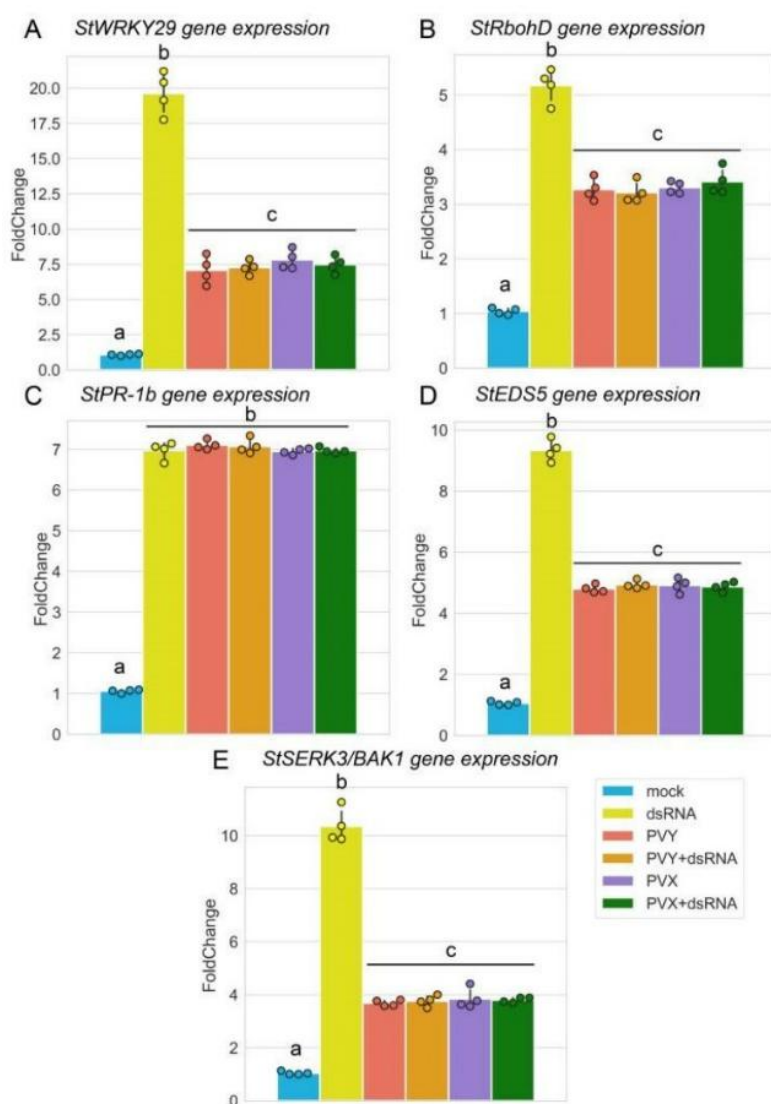
Распределение покрытия прочтений по геному PVY^{NTN} в образцах, обработанных дцРНКpvу (А) и необработанных (В) листьев. В качестве контроля показано покрытие последовательностей PVY в инокулированных (А) и системных (В) листьях, инфицированных PVY растений. Отдельные графики соответствуют независимым биологическим повторам (Rep). Схематическая организация генома PVY представлена над графиками; целевая область PVY, использованная для дизайна дцРНКpvу, выделена серым цветом.

При оценке системного транспорта дцРНКpvу, её последовательности 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. 4В). 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 дцРНКpvу 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.

Мы исследовали дцРНКpvу как возможный элиситор паттерн-индуцированного иммунитета (PTI) у картофеля и оценили, способна ли она индуцировать PTI-подобные

сигнальные пути в наших экспериментах. Гены-маркеры РТИ у картофеля были отобраны на основе литературных данных о генах, индуцируемых каноническими элиситорами РТИ, такими как flg22, elf18 (elongation factor Tu) и Pep25 (олигопептидный фрагмент белка клеточной стенки *Phytophthora sojae* массой 42 кДа). Полученные результаты показали, что дцРНК_{pvu} стимулирует экспрессию ряда генов, традиционно ассоциированных с активацией РТИ. В частности, дцРНК_{pvu} 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_{pvu} запускает комплексный клеточный ответ, включающий различные молекулярные компоненты защитных реакций растений против вирусной инфекции (рис. 5А–Е).



значения ($p < 0,001$).

Рисунок 5. Экспрессия генов-маркеров РТИ у растений картофеля при заражении PVY и PVX под воздействием дцРНК_{pvu}. (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 моск 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

Учитывая, что механизмы дцРНК-опосредованного РТИ у *Arabidopsis* и *Nicotiana benthamiana* включают усиленное отложение каллозы в плазмодесмах, что может ограничивать межклеточный транспорт вирусов, мы проверили, способна ли дцРНКру аналогичным образом увеличивать отложение каллозы у картофеля. Как показано на рис. 6А–С, растения картофеля также отвечали на обработку дцРНКру усиленным отложением каллозы. Примечательно, что PVY и PVX сами по себе также стимулировали экспрессию тех же РТИ-ассоциированных генов и отложение каллозы, хотя и в меньшей степени, чем при обработке одной дцРНКру. 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 дцРНКру 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.

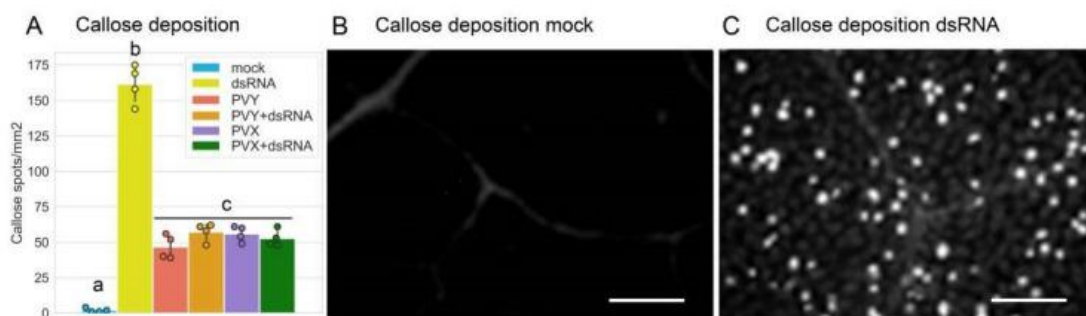


Рисунок 6. Влияние дцРНКру на отложение каллозы в листьях растений картофеля сорта Индиго, инфицированных PVY и PVX. (А) Количественная оценка отложения каллозы в системных и моск-листьях через 7 дней после обработки. Статистический анализ выполнен по четырём независимым биологическим повторам; данные 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 дцРНКру (С), через 7 дней после обработки. Масштабная линейка — 50 мкм.

Таким образом, наши результаты показывают, что дцРНКру способна индуцировать два независимых механизма защиты: РНК-интерференцию и РТИ.

Поли(АДФ-рибозилирование) рассматривается как важный регулятор иммунного ответа растений и связано с РТИ. Ранее показано участие генов, кодирующих поли(АДФ-рибоза)-полимеразу (PARP) и поли(АДФ-рибоза)-гликогидролазу (PARG), в регуляции устойчивости растений к биотическому стрессу. В связи с этим нами было исследовано влияние дцРНКру на экспрессию генов метаболизма поли(АДФ-рибозы) у картофеля методом ПЦР-РВ. Для анализа были выбраны гены *StPARP1* и *StPARG*, являющиеся гомологами ключевых компонентов системы PAR-метаболизма *Arabidopsis*.

Согласно полученным данным, дцРНК_{pvu}, а также инфекции PVY и PVX (в присутствии или отсутствии дцРНК) не оказывали существенного влияния на экспрессию гена *StPARP1* (рис. 7А). В то же время экспрессия *StPARG* значимо повышалась в ответ на обработку дцРНК_{pvu} по сравнению с необработанными растениями (рис. 7В). Инфекция PVY и PVX также стимулировала экспрессию *StPARG*, но в меньшей степени, чем обработка одной дцРНК_{pvu}. При совместном воздействии вирусной инфекции (PVY или PVX) и дцРНК_{pvu} 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. 7В).

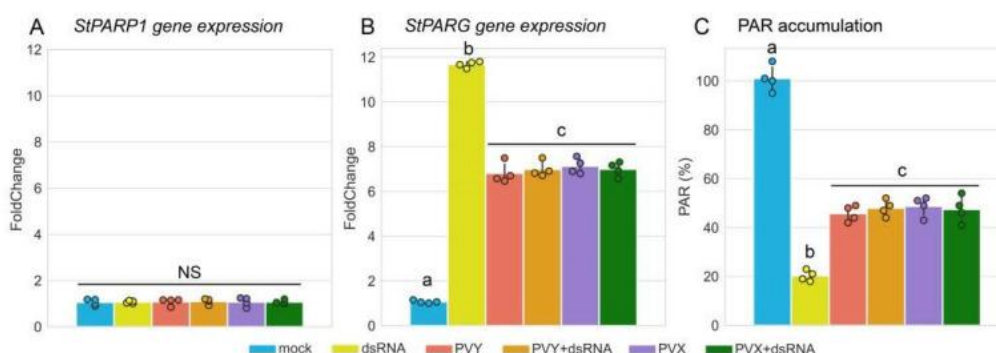


Рисунок 7. Изменения PAR-ассоциированного метаболизма у растений картофеля под действием дцРНК_{pvu} при инфекции PVY и PVX (А, В). Профили экспрессии генов *StPARP1* (А) и *StPARG* (В) по данным ПЦР-РВ через 7 дней после обработки. Уровни экспрессии мРНК нормализованы по генам внутреннего контроля *StEF-1α* и *StCox*. Статистический анализ проводили по четырём независимым биологическим повторам; данные представлены как среднее $\pm$ SD. (С) Накопление поли(АДФ-рибозилированных) белков оценивали методом ИФА с использованием кроличьих поликлональных антител к 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}. При этом растения с повышенной экспрессией *StPARG* характеризовались сниженным уровнем PAR. Полученные результаты позволяют предположить, что индуцированная экзогенной дцРНК_{pvu} активация PARG и последующее снижение уровня PAR могут участвовать в регуляции РТИ-ассоциированных защитных реакций и формировании противовирусного иммунитета у картофеля (рис.7С).

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 PARC и соответствующим снижением уровня PAR. Это указывает на формирование комплексного многоуровневого противовирусного ответа растений.

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: (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. 8A), так и верхние неинокулированные (рис. 8B) листья PVY-инфицированных растений содержали типичные вирусспецифические миРНК 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.

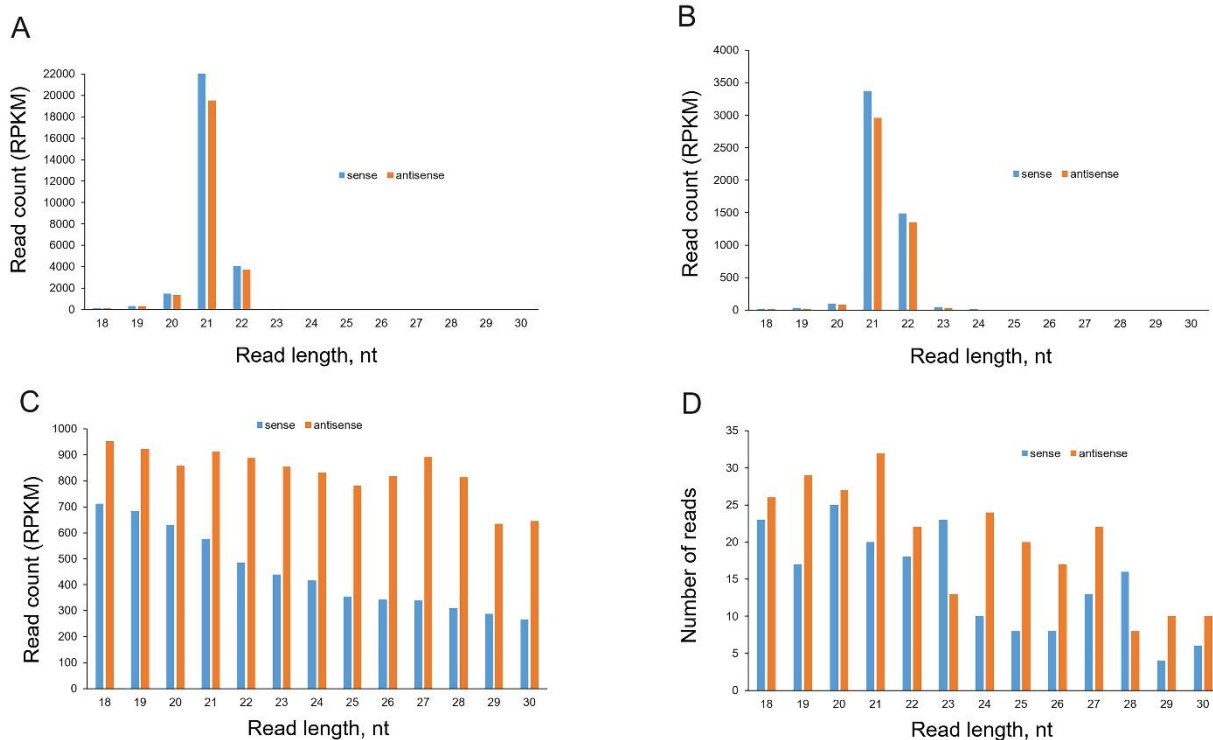


Рисунок 8. Профили размера и полярности PVY-специфичных миРНК. Считывания малых РНК, полученные из инокулированных (А) и системно инфицированных (неинокулированных) (В) листьев PVY-инфицированных растений, а также из обработанных (С) листьев растений, обработанных дцРНКrvу, сопоставляли без допущения 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 дцРНКrvу, в которых также обнаруживались дцРНК-производные малые РНК.

В листьях неинфицированных PVY растений, обработанных только дцРНКrvу, 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. 8С). Такой характер распределения предполагает, что эти малые РНК, вероятно, не являются продуктами DCL-подобных ферментов, поскольку для Dicer-подобных белков характерно образование дискретных классов малых РНК. Тем не менее во всех образцах этих листьев регистрировались только те малые РНК, которые были строго комплементарны участку генома PVY, использованному для конструирования дцРНКrvу. Это однозначно указывает на специфическое, определяемое нуклеотидной последовательностью происхождение неканонической популяции малых РНК длиной 18–30 нт (рис. 9С, D и 10).

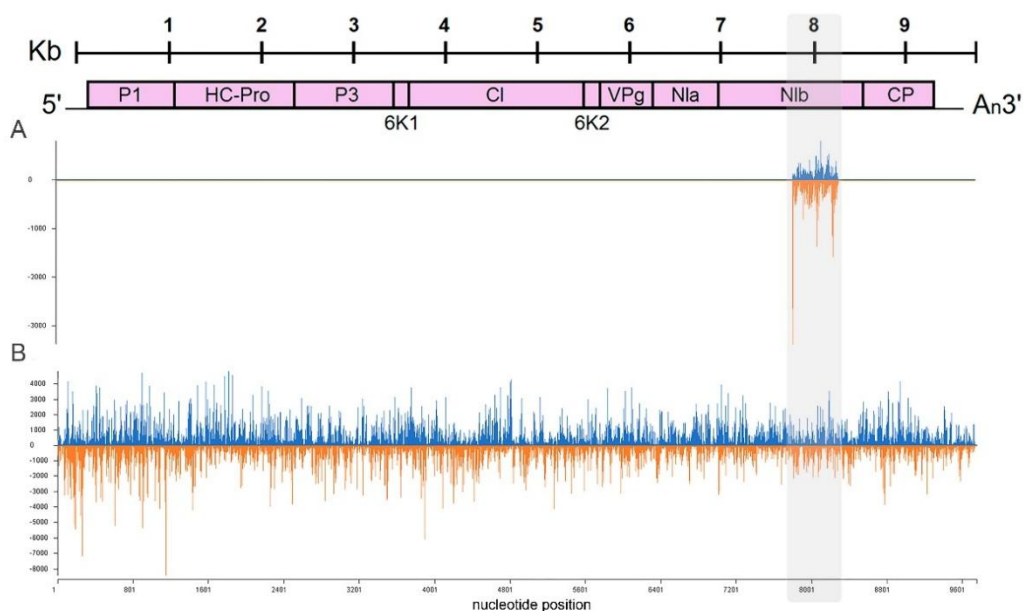


Рисунок 9. Репрезентативные карты распределения малых РНК по геному PVY с нуклеотидным разрешением, полученных из дцРНКrvу (А) и PVY (В). Малые РНК картировали на референсный геном PVY^{NTN}. Столбцы над осью представляют количество смысловых прочтений, начинающихся с данной позиции; столбцы под осью — количество антисмысловых прочтений, заканчивающихся в соответствующей

позиции. Схематическая организация генома PVY показана над гистограммами; целевая область PVY, использованная для конструирования дцРНК_{pvу}, выделена серым цветом.

Для оценки способности индуцированных дцРНК_{pvу} малых РНК к системному транспорту анализировали PVY-специфичные малые РНК в верхних необработанных листьях растений после обработки нижних листьев дцРНК_{pvу}. Малые РНК, соответствующие области дцРНК_{pvу}, были обнаружены через 7 суток в двух из четырёх биологических повторов, что указывает на возможность системного перемещения дцРНК или её производных.

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_{pvу} 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. 10). Аналогичная тенденция наблюдалась и в системных листьях неинфицированных растений, обработанных дцРНК_{pvу}: количество антисмысловых малых РНК было выше, чем смысловых (рис. 10D). 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. 10A, B и рис. 11).

Поскольку помимо длины малой РНК важнейшее значение для её функциональной специфичности имеет 5'-концевой нуклеотид, определяющий предпочтительную загрузку в те или иные AGO-комплексы, 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. 10). 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. 10C, D). Такой профиль согласуется с преимущественной загрузкой этих малых РНК в AGO1-, AGO2- и AGO5-подобные белки соответственно, как это было показано для *Arabidopsis*. Несмотря на более переменное 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 миРНК (рис. 10).

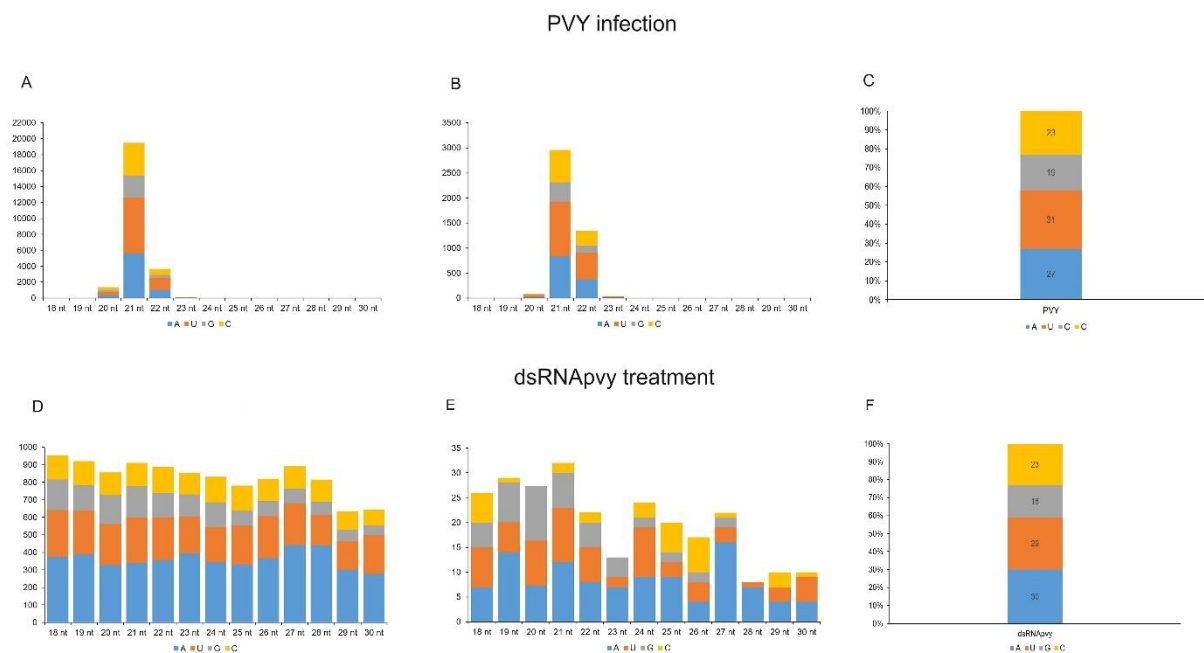


Рисунок 10. Профили 5'-нуклеотидов основных размерных классов антисмысловых малых РНК, происходящих из дцРНК_{PVY} и PVY. Считывания малых РНК из инокулированных (А) и системно инфицированных (В) листьев PVY-инфицированных растений, а также из обработанных (D) и необработанных (Е) листьев растений, подвергшихся обработке дцРНК_{PVY}, 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. (С, F) Показано процентное содержание нуклеотидов А, U, G, С в полном геноме PVY и в фрагменте, использованном для конструирования дцРНК_{PVY}, соответственно.

Сравнительный анализ профилей малых РНК в листьях растений, одновременно инфицированных PVY и обработанных дцРНК_{PVY}, показал наличие значительного пула неканонических (18–30 нт) малых РНК, точно соответствующих области генома PVY, использованной для дизайна дцРНК (рис. 11А). Для оценки возможности того, что эти первичные неканонические малые РНК инициируют образование вторичных транзитивных малых интерферирующих РНК, были проанализированы профили малых РНК в двух 200-нуклеотидных зонах по обе стороны от мишени дцРНК_{PVY}. 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. 11А), что свидетельствует об отсутствии транзитивного распространения сигнала РНК-интерференции (рис. 11В).

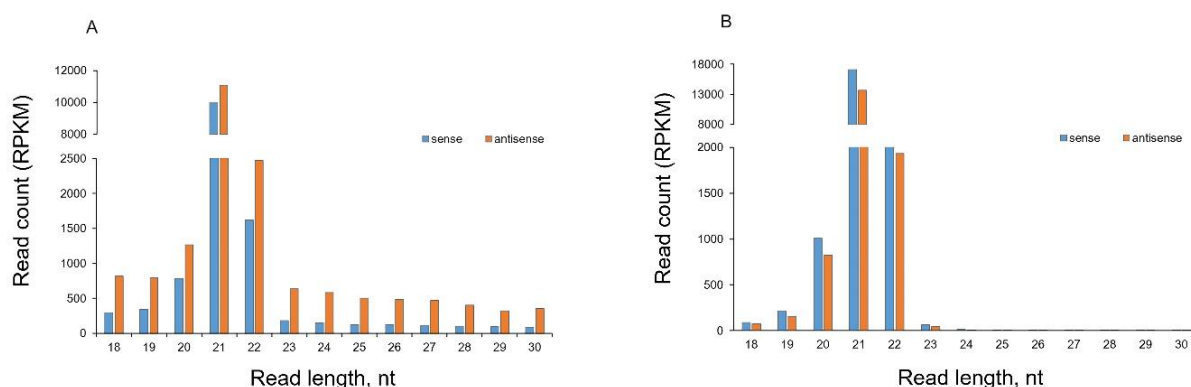


Рисунок 11. Профили размера и полярности PVY-специфичных малых РНК, обнаруженных в листьях растений, обработанных дцРНК_{pvу} и инфицированных PVY. (А) малые РНК, картированные на целевой участок генома PVY (нт 7739–8238), использованный для конструирования дцРНК_{pvу}. (В) малые РНК, картированные без 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 цветокодированных гистограмм как средние значения четырёх биологических повторов.

Полученные данные указывают на то, что экзогенно нанесённая дцРНК_{pvу} подвергается расщеплению с образованием фракции неканонических малых РНК различной длины, однако эти малые РНК не индуцируют транзитивную амплификацию и распространение вторичных малых интерферирующих РНК 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_{pvу}.

4. Генетическое разнообразие вариантов вируса картофеля Y и его использование для оптимизации дизайна PVY-специфической дцРНК

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

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 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 РФ, 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. 12). Среди выявленных патогенов доминирующее положение занимает PVY, 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.

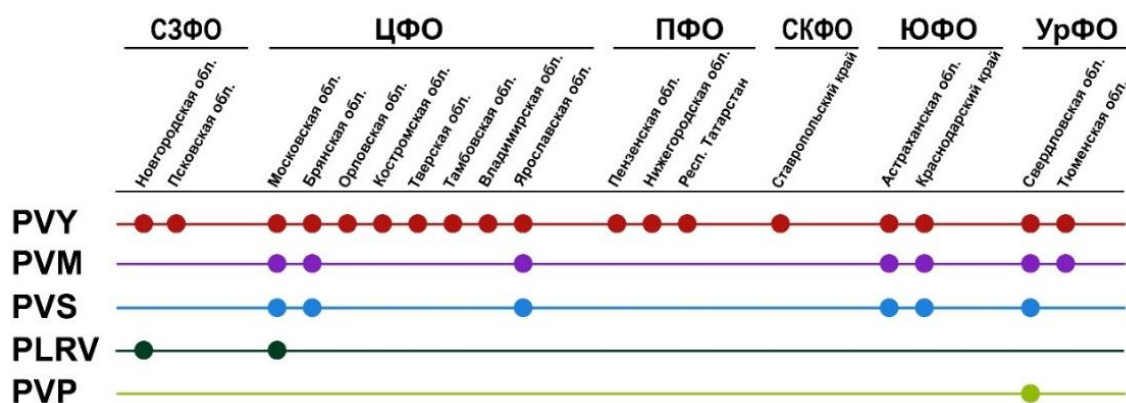


Рисунок 12. География распространения вирусов картофеля в регионах РФ. Регионы РФ сгруппированы по федеральным округам: СЗФО – Северо-Западный, ЦФО – Центральный, ПФО – Приволжский, СКФО – Северо-Кавказский, ЮФО – Южный, УрФО – Уральский. Цветные линии обозначают вирусы: PVY (Potato virus Y), PVM (Potato virus M), PVS (Potato virus S), PLRV (Potato leafroll virus), PVP (Potato virus P). Точки отражают регионы, в которых были обнаружены соответствующие вирусы.

Филогенетический анализ, выполненный на основе 158 полноразмерных контингов PVY, содержащих полную нуклеотидную последовательность полипротеина, а также 165 репрезентативных изолятов из базы данных GenBank, продемонстрировал высокое генетическое разнообразие PVY в исследованных регионах РФ. Анализ полученных данных показал, что рекомбинантные варианты NTNa и NTNb доминируют практически во всех обследованных регионах. Если ранее основным вариантом PVY в РФ считался NTNa, то результаты настоящего исследования свидетельствуют о сопоставимой по масштабам распространённости варианта NTNb. Отмечено расширение ареала рекомбинантного варианта N-Wi, который был выявлен в семи регионах РФ (рис. 13). Наибольшее разнообразие рекомбинантных вариантов PVY было зафиксировано в Астраханской и Московской областях (NTNa, NTNb, N-Wi, SYR-I, SYR-II, SYR-III, N:O, 261-4). Следует

отметить, что для указанных регионов был проанализирован наибольший объем образцов, что могло оказать влияние на выявленный уровень разнообразия.

Описанные нами новые рекомбинантные варианты PVY^{Ast-A-I} и PVY^{Ast-A-II}, впервые выявленные в Астраханской области, были также обнаружены в образцах из Брянской, 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 РФ двух устойчивых филогенетических линий PVY: доминирующей линии рекомбинантов типа Eu-N и более гетерогенной группы, представленной рекомбинантами 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.

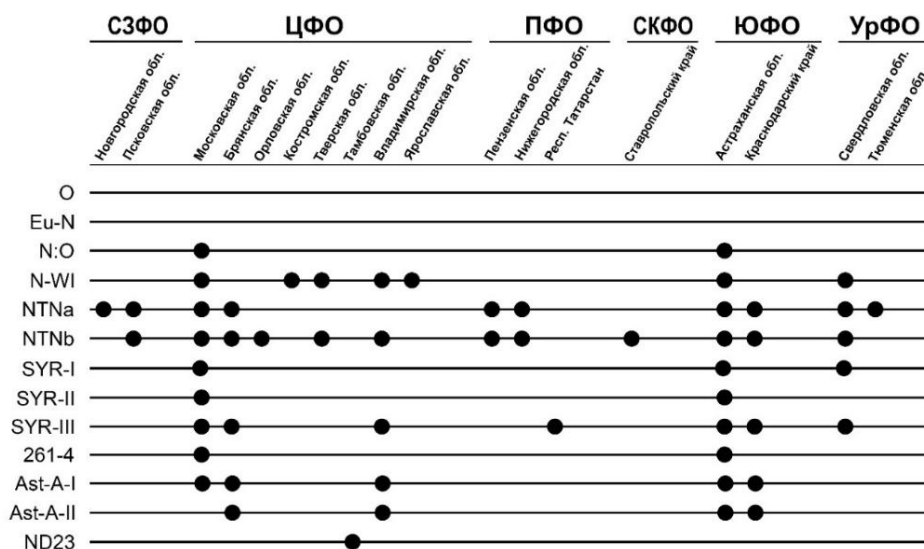


Рисунок 13. Географическое распределение рекомбинантных вариантов PVY, выявленных в регионах РФ. Регионы сгруппированы по федеральным округам (СЗФО – Северо-Западный, ЦФО – Центральный, ПФО – Приволжский, СКФО – Северо-Кавказский, ЮФО – Южный, УрФО – Уральский). Слева даны названия выявленных рекомбинантов PVY. Точки отражают присутствие соответствующего варианта PVY в регионе РФ.

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 были нацелены исходные лабораторные 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.

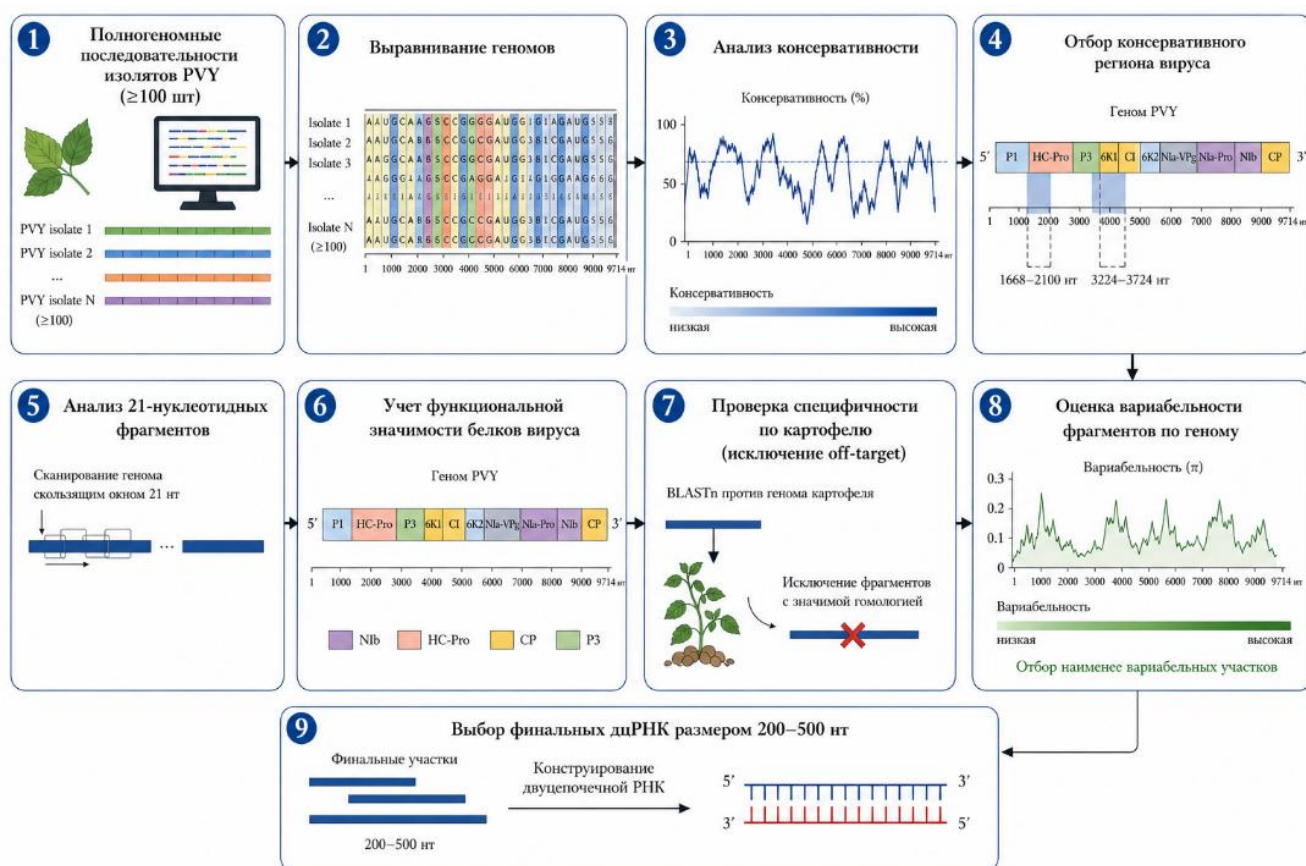


Рисунок 14. Алгоритм отбора участков генома PVY для конструирования дцРНК.

При разработке дцРНК, направленных на подавление вируса PVY, реализованы ключевые критерии отбора целевых участков генома (рис. 15). В результате анализа полного набора полнотеломных последовательностей вариантов PVY выявлены высококонсервативные регионы, содержащие наибольшее число идентичных 21-нуклеотидных фрагментов, потенциально формирующих эффективный пул миРНК. Это обеспечивает возможность воздействия на широкий спектр циркулирующих 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_{pvu} (1668–2100 нт) и дцРНК_{rvu} (3224–3724 нт) по нумерации референсной последовательности PVY (рис. 15).

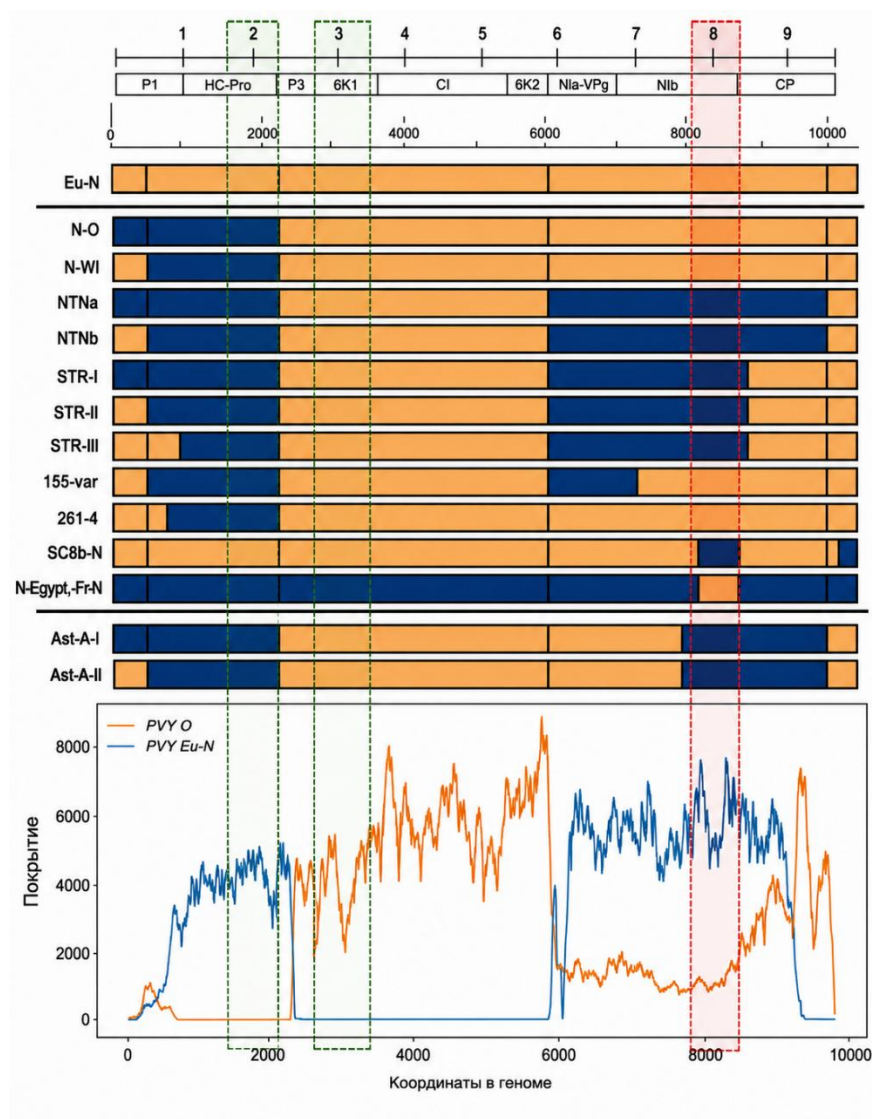


Рисунок 15. Схематическая организация генома PVY и распределение покрытия ридов по координатам генома PVY^O (оранжевый цвет) и PVY^{Eu-N} (синий цвет). Красным цветом обозначен участок, соответствующий дцРНК, использованной в лабораторных экспериментах; зелёным цветом выделены новые дцРНК, разработанные в рамках настоящего исследования.

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

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 дцРНК являются важным инструментом функциональной геномики, позволяющим избирательно подавлять экспрессию целевых генов и исследовать механизмы регуляции генетической активности.

Результаты 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 PAMP-зависимые сигнальные пути. Выявлены нетипичные популяции малых РНК длиной 18–30 нуклеотидов, что указывает на возможное участие альтернативных путей их биогенеза.

Проведён анализ генетического разнообразия популяций PVY в 19 регионах РФ. Выявлено широкое распространение рекомбинантных форм вируса, включая ранее неописанные рекомбинанты Ast-A-I и Ast-A-II, обнаруженные нами в Астраханской области.

Интеграция данных о природном разнообразии PVY с результатами лабораторных исследований позволила перейти к разработке универсальных дцРНК, нацеленных на консервативные участки генома вируса. Полученные результаты подтверждают перспективность РНК-технологий для создания экологически безопасных средств защиты картофеля от PVY и служат основой для дальнейшей оптимизации РНК-биопрепаратов.

Выводы

1. Применение экзогенной специфической дцРНК_{PVY} 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_{PVS} против вируса картофеля S, а также в отношении инфекции неродственного вируса картофеля X.
2. Применение экзогенной дцРНК_{PVY} формирует комплексный противовирусный ответ растений картофеля, сочетающий механизмы РНК-интерференции, паттерн-индуцированной и PAMP-ассоциированной регуляции иммунитета.
3. Анализ данных высокопроизводительного секвенирования малых РНК показал, что при экзогенном применении дцРНК_{PVY} 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_{PVY} 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 вирусспецифической дцРНК. Предсказаны и синтезированы две дцРНК против консервативных участков, универсальных для большинства рекомбинантных геномов вируса, для эффективного подавления широкого спектра циркулирующих в РФ вариантов вируса.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

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.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю Михаилу Эммануиловичу Тальянскому и Калининой Наталье Олеговне за руководство работой, ценные рекомендации и постоянную поддержку.

Автор благодарит сотрудников лаборатории функциональной геномики и протеомики растений ГНЦ ИБХ РАН за помощь в проведении исследований и обсуждении результатов работы.

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