

Научная статья

УДК 573.6/578

DOI: 10.37102/0869-7698_2022_225_05_1

Биотехнологии для создания растений, устойчивых к вирусам

Н.Н. Нитяговский✉, А.П. Тюнин, Н.М. Санина

Николай Николаевич Нитяговский

аспирант

Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

ФНЦ Биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток, Россия

nityagovskii@biosoil.ru

<http://orcid.org/0000-0001-5029-1975>

Алексей Петрович Тюнин

кандидат биологических наук

ФНЦ Биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток, Россия

tyunin@biosoil.ru

<http://orcid.org/0000-0002-6467-8596>

Нина Михайловна Санина

доктор биологических наук, профессор

Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

sanina.nm@dvfu.ru

<http://orcid.org/0000-0001-5838-691X>

Аннотация. Культурные растения во всем мире подвергаются вредному воздействию вирусных заболеваний, что ежегодно наносит существенный экономический ущерб сельскому хозяйству. РНК-интерференция является одним из естественных механизмов борьбы растений с вирусной инфекцией. В данном обзоре рассмотрены примеры применения биотехнологических методов для индукции механизма РНК-интерференции в растениях, которые могут быть применены для создания сельскохозяйственных растений, устойчивых к различным вирусным заболеваниям.

Ключевые слова: растения, РНК-интерференция, двуцепочечные РНК, искусственные микроРНК, устойчивость к вирусам, трансформация, внешняя обработка двуцепочечной РНК

Для цитирования: Нитяговский Н.Н., Тюнин А.П., Санина Н.М. Биотехнологии для создания растений, устойчивых к вирусам // Вестн. ДВО РАН. 2022. № 5. С. 5–16. http://dx.doi.org/10.37102/0869-7698_2022_225_05_1.

Biotechnologies for the development of virus-resistant plants

N.N. Nityagovsky✉, A.P. Tyunin, N.M. Sanina

Nikolai N. Nityagovsky

PhD student

Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity FEB RAS, Vladivostok, Russia

nityagovskii@biosoil.ru

<http://orcid.org/0000-0001-5029-1975>

Aleksei P. Tyunin

Candidate of Sciences in Biology

Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity FEB RAS, Vladivostok, Russia

tyunin@biosoil.ru

<http://orcid.org/0000-0002-6467-8596>

Nina M. Sanina

Doctor of Science in Biology, Professor

Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

sanina.nm@dvfu.ru

<http://orcid.org/0000-0001-5838-691X>

Abstract. Cultivated plants all over the world are exposed to harmful effects from viral diseases, which annually causes significant economic damage to agriculture. RNA interference is one of the natural mechanisms of controlling viral infections by plants. In this review, examples of biotechnologies application for RNA interference induction that can be applied in the creation of agriculturally valuable plants that are resistant to various viral diseases are discussed.

Keywords: plants, RNA interference, double-stranded RNA, artificial microRNA, resistance to viruses, transformation, double-stranded RNA external treatment

For citation: Nityagovsky N.N., Tyunin A.P., Sanina N.M. Biotechnologies for the development of virus-resistant plants. *Vestnik of the FEB RAS*. 2022;(5):5-16. (In Russ.). http://dx.doi.org/10.37102/0869-7698_2022_225_05_1.

Введение

Вирусы наносят серьезный ущерб урожаю сельскохозяйственных растений во всем мире. Вызванные вирусными заболеваниями мировые экономические потери ежегодно оцениваются более чем в 30 млрд долл. США [1]. Согласно национальному докладу о карантинном фитосанитарном состоянии на территории Российской Федерации в 2020 г. в 19 субъектах установлена фитосанитарная зона суммарно на 10 726 га из-за вируса оспы сливы (PPV – Plum pox virus) (Patatavirales: Potyviridae, *Potyvirus*), являющегося пагубным вирусным заболеванием, которое поражает культурные растения персиков, абрикосов, слив и других представителей рода *Prunus*. Также в докладе высказываются опасения по поводу вирусов коричневой морщинистости плодов томата (ToBRFV – Tomato brown rugose

fruit virus) (Martellivirales: Virgaviridae, *Tobamovirus*), мозаики дынной груши (PerMV – Pepino mosaic virus) (Tymovirales: Alphaflexiviridae, *Potexvirus*) и пятнистого увядания томатов (TSWV – Tomato spotted wilt virus) (Bunyavirales: Tospoviridae, *Orthotospovirus*), которые активно распространяются по всему миру и представляют серьезную угрозу для сельского хозяйства России, поскольку вызывают большие потери урожая у таких культур, как томат, перец, салат, картофель, виноград, табак и др. Например, при заражении вирусом коричневой морщинистости плодов томата от 5 до 25 % площадей предприятий, занимающихся промышленным производством плодов томата в Российской Федерации, расчет потенциального экономического ущерба составляет от 1,77 до 9,40 млрд руб. [2].

Большую опасность вирусные заболевания сельскохозяйственных растений представляют для Дальнего Востока России. Наши коллеги из лаборатории вирусологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН провели эколого-вирусологический мониторинг фитовирусов на юге российского Дальнего Востока (на территории Амурской области, Приморского и Хабаровского краев, Еврейской автономной области). Были выявлены 16 фитовирусов, которые поражают овощные и бахчевые сельскохозяйственные культуры, среди которых наибольшую эпифитотическую опасность для агроценозов представляют вирус огуречной мозаики (CMV – Cucumber mosaic virus) (Martellivirales: Bromoviridae, *Cucumovirus*) и вирус томатной мозаики (ToMV – Tomato mosaic virus) (Martellivirales: Virgaviridae, *Tobamovirus*), снижающие массу и товарный вид плодов у пораженных растений [3]. Среди злаковых были найдены 10 фитовирусов, наиболее распространенным среди которых является вирус штриховатой мозаики ячменя (BSMV – Barley stripe mosaic virus) (Martellivirales: Virgaviridae, *Hordeivirus*), вызывающий задержку роста у инфицированных культур [4]. 18 вирусов были обнаружены на растениях семейства бобовые, в частности у сои, которая является основной культурой в структуре сельского хозяйства на Дальнем Востоке. Среди них вирус мозаики сои (SMV – Soybean mosaic virus) (Patavirales: Potyviridae, *Potyvirus*) считается наиболее вредоносным за способность в 2–3 раза снижать урожайность пораженных растений и ухудшать качество семян [5].

Механизм РНК-интерференции растений в контексте противовирусной защиты

После проникновения вируса в клетку в ней запускается ответная реакция со стороны растения, основным компонентом которой является механизм РНК-интерференции, упрощенная схема которого представлена на рис. 1. Главным индуктором запуска этого механизма является появление в цитоплазме клетки двуцепочечной РНК. Эти двуцепочечные РНК образуются в результате репликации вируса (для РНК-вирусов), двунаправленной транскрипции вирусного генома (для ДНК-вирусов), образования двуцепочечных дуплексов вирусной РНК и биосинтеза эндогенными РНК-зависимыми РНК-полимеразами. Далее двуцепочечная РНК нарезается Dicer-подобными белками (DCL) на короткие, длиной от 20 до 24 пар нуклеотидов, двуцепочечные фрагменты (дуплексы). Большинство растений имеют в своем геноме до четырех генов, кодирующих белки семейства DCL, но основными участниками в противовирусной защите считаются ферменты DCL2 и DCL4, инактивация которых в *Arabidopsis thaliana* была необходимой и достаточной для восстановления системной вирусной инфекции у дефектного вируса [6]. После гидролиза РНК-полимеров ферментами DCL смысловые и антисмысловые цепочки этих коротких дуплексов, называемые «малыми интерферирующими РНК (миРНК)», входят в состав сложного белкового комплекса, который называется «РНК-индуцированный комплекс замолкания» (RNA-inducing silencing complex, RISC). Ключевым компонентом этого комплекса являются белки-эндонуклеазы семейства ARGONAUT (AGO). Так, в геноме *A. thaliana* имеется 10 генов этого семейства, среди которых AGO1 и AGO2 являются наиболее важными в защите от вирусов [7]. Белки AGO используют нуклеотидные

последовательности миРНК в качестве молекул узнавания вирусных последовательностей, с помощью которых они связываются с ними по принципу комплементарности и разрезают их, что приводит к деградации вирусной рибонуклеиновой кислоты.

Помимо защиты от вирусов РНК-интерференция участвует в процессах регуляции роста и развития растения с помощью закодированных в геноме малых РНК длиной 21–22 нуклеотида, которые формируются из предшественников длиной ~80–250 нуклеотидов. Этот тип малых РНК получил название «микроРНК». В процессе «созревания» молекул микроРНК участвуют те же представители семейства ферментов, описанные ранее, основными из которых являются DCL1 и AGO1. Подробно роль микроРНК в регуляции процессов жизнедеятельности растений описана в обзоре [8]. Применение микроРНК в биотехнологии растений рассматривается в разделе «Формирование устойчивости к вирусам с помощью трансформации конструкцией искусственной микроРНК».

В процессе коэволюции с растениями фитовирусы получили широкий спектр белков-супрессоров, направленных против отдельных компонентов РНК-интерференции. Например, один из наиболее изученных белков-супрессоров – белок 2b из вируса огуречной мозаики ингибирует механизм РНК-интерференции, связываясь с двуцепочечной РНК и белками AGO1, AGO4 и AGO6 [9]. Другие примеры противодействия вирусов РНК-интерференции растений описаны в работе [10]. Таким образом, с помощью белков-супрессоров фитовирусные агенты подавляют защитные механизмы растений на молекулярном уровне, что упрощает дальнейшее распространение вирусных частиц в растительных тканях (рис. 1).

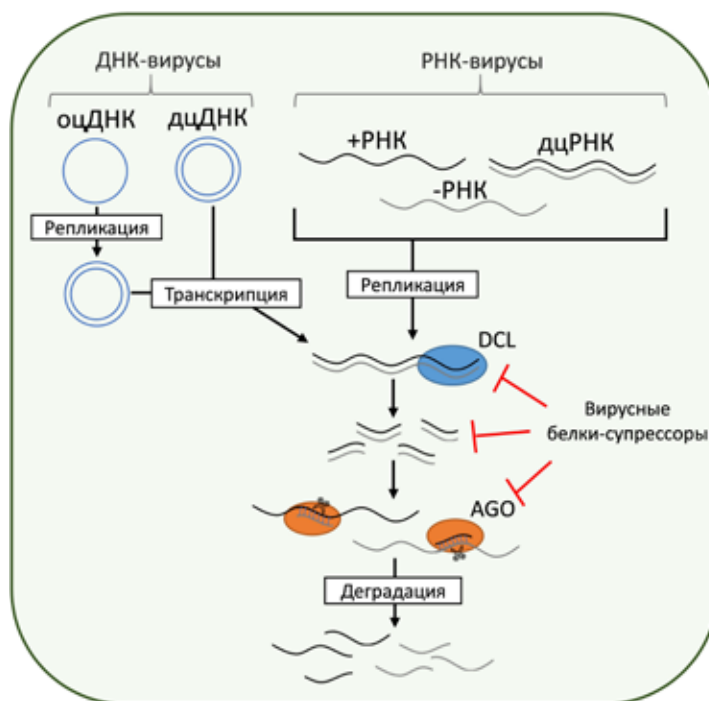


Рис. 1. Механизм РНК-интерференции в растениях (упрощенно). оцДНК – одноцепочечная ДНК; дцДНК – двуцепочечная ДНК; +РНК – смысловая цепь РНК; -РНК – антисмысловая цепь РНК; дцРНК – двуцепочечная РНК

Биотехнологические методы для индукции РНК-интерференции растений

Повысить уровень антивирусной защиты могут методы, направленные на активацию ключевых компонентов механизма РНК-интерференции растения и обращения

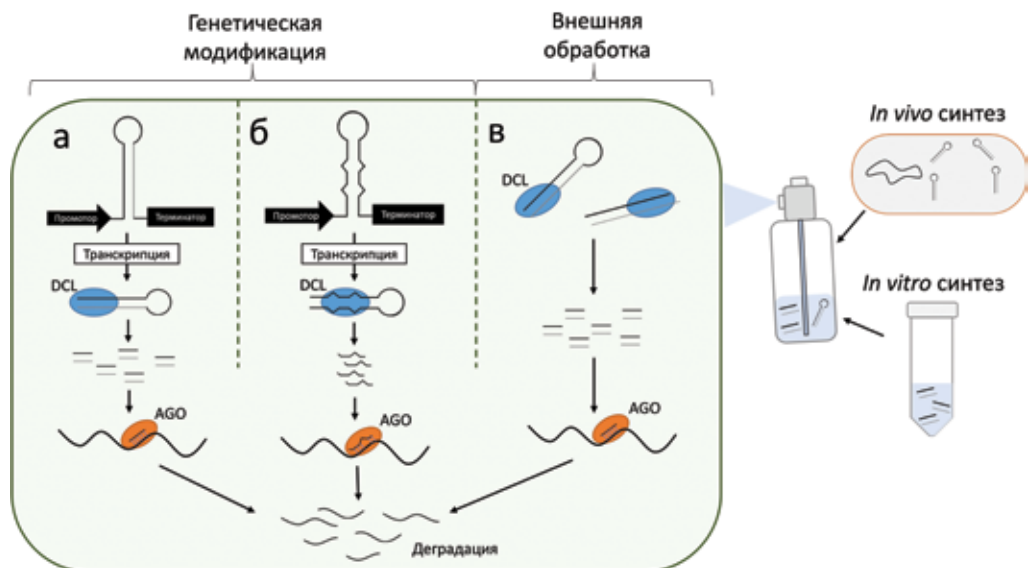


Рис. 2. Биотехнологии для индукции РНК-интерференции: *а* – трансформация растений двуцепочечной РНК; *б* – трансформация растений предшественником искусственной микроРНК; *в* – внешняя обработка растений раствором синтезированной двуцепочечной РНК *in vitro* или *in vivo*

их против нуклеотидных последовательностей инвазивных нуклеиновых кислот патогенов. Одним из наиболее распространенных подходов на этом пути является генетическая трансформация растений конструкциями, содержащими смысловые или антисмысловые нуклеотидные последовательности, которые копируют нуклеотидные последовательности вирусного генома. Транскрипты таких конструкций могут принимать форму двуцепочечной РНК, способной к формированию вторичной структуры типа «шпилька», где комплементарные последовательности соединены между собой интроном или другим «спейсером» (рис. 2, *а*), или форму предшественника микроРНК (рис. 2, *б*). Другим подходом является обработка растений *in vitro* или *in vivo* растворами искусственно синтезированной двуцепочечной РНК, которая содержит нуклеотидные последовательности патогена (рис. 2, *в*). Оба метода индуцируют процессы РНК-интерференции, что селективно увеличивает устойчивость растения к определенным штаммам, ингибируя развитие вирусной инфекции.

Данные подходы по усилению РНК-интерференции нашли успешное применение в создании устойчивых к вирусам ценных с точки зрения сельского хозяйства растений, таких как картофель, рис, пшеница, томат, соя и др.

Формирование устойчивости к вирусам с помощью трансформации конструкцией двуцепочечной РНК

Трансформация растений конструкциями двуцепочечной РНК, содержащими нуклеотидные последовательности патогенной природы, является эффективным способом придания устойчивости к вирусам у различных культурных растений. Как правило, для придания устойчивости к определенным штаммам вирусов в качестве мишеней выбираются нуклеотидные последовательности, кодирующие вирусные белки-супрессоры или белки, которые отвечают за проникновение в клетку, деление и/или распространение вируса. Затем с помощью ПЦР и методов молекулярной инженерии формируется вектор, кодирующий двуцепочечную РНК, которая состоит из вирусных нуклеотидных фрагментов, под контролем промотора. Затем производится генетическая трансформация растений

данной конструкции с последующим отбором трансгенных линий. В результате в полученных трансгенных растениях с высокой частотой транскрибируется двуцепочечная РНК, из которой формируются миРНК, а полученные миРНК используются механизмом РНК-интерференции в борьбе с вирусной инфекцией.

Например, агробактериальная трансформация культуры коммерческой сливы (*Prunus domestica* L. cv. Startovaya) конструкцией двуцепочечной РНК, содержащей нуклеотидные фрагменты гена белка оболочки из вируса оспы сливы, обеспечила устойчивость к данному штамму у трансгенных растений. К 5 независимым молодым трансгенным растениям были привиты почки, зараженные вирусом оспы сливы штамма Marcus. По данным ОТ-ПЦР, DAS-ELISA, вестерн-блота, ImmunoStrip-теста и визуальных наблюдений деревья трансгенной сливы оставались незараженными в течение 9 лет, в то время как зараженные ветви, развившиеся из привитых почек, проявляли явные симптомы болезни в течение многих лет и поддерживали высокий уровень накопления вируса [11]. В другом исследовании были получены трансгенные растения томата, транскрибирующие двуцепочечную РНК, которая состоит из консервативных последовательностей 3 изолятов вируса мозаики дынной груши. Из 14 полученных линий 2 линии, обладающие наибольшей аккумуляцией миРНК, при проверке показали устойчивость к 6 изолятам вируса [12]. Высокий уровень устойчивости к вирусу черной полосатой карликовости риса (RBSDV – Rice black-streaked dwarf virus) (Reovirales: Reoviridae, *Fijivirus*) у риса в полевых условиях был получен в результате трансформации двуцепочечной РНК, в качестве мишеней которой были использованы транскрипты генов *S7-2* и *S8*, кодирующие белки, которые участвуют во взаимодействии растения и вируса [13].

Пример успешного создания устойчивости к множественной вирусной инфекции показан в исследовании [14]. Вирусы X-вирус картофеля (PVX – Potato virus X) (Tymovirales: Alphaflexiviridae, *Potexvirus*), S-вирус картофеля (PVS – Potato virus S) (Tymovirales: Betaflexiviridae, *Carlavirus*) и Y-вирус картофеля (PVY – Potato virus Y) (Patatavirales: Potyviridae, *Potyvirus*) являются причиной серьезных потерь урожая картофеля. Фрагменты кодирующих последовательностей белка оболочки каждого из вирусов были объединены в единой конструкции двуцепочечной РНК. Полученной конструкцией под контролем конститутивного промотора были трансформированы экспланты картофеля, которые затем были регенерированы в молодые растения. Полученные 12 трансгенных линий растений показали высокую устойчивость к 3 штаммам вируса по отдельности и при множественной инфекции [14].

Таким образом, трансформация конструкцией двуцепочечной РНК может использоваться как для создания устойчивости у растений к одному вирусу, так и против множественной инфекции. Однако конструкции могут сильно варьировать по эффективности придания устойчивости вирусам. Так, китайские ученые из Национального центра улучшения сои разработали конструкцию в виде «шпильки» на основе фрагмента гена белка-супрессора HC-Pro из вируса мозаики сои штамма SC3, вызывающего тяжелые заболевания у растений сои. Были получены 1059 трансгенных растений поколения T₁, содержащих конструкцию, из которых 41,6 % обладали высокой устойчивостью, а 16,1 % были восприимчивы к вирусу. Остальные растения обладали умеренной или отсроченной устойчивостью [15]. В другом исследовании растения табака были трансформированы конструкцией двуцепочечной РНК, содержащей фрагменты генов белка оболочки из Y-вируса картофеля, вируса табачной мозаики (TMV – Tobacco mosaic virus) (Martellivirales: Virgaviridae, *Tobamovirus*) и вируса огуречной мозаики, которые широко распространены и вызывают серьезные заболевания у растений семейства Пасленовые. Из 1018 полученных трансгенных растений иммунитетом к 3 штаммам вируса обладали 18 % [16].

Одной из причин вариабельности уровня устойчивости среди трансгенных линий растений может быть различный уровень аккумуляции у них миРНК, направленных против нуклеотидных последовательностей экзогенных нуклеиновых кислот патогенов. В рамках исследования по созданию устойчивости к болезни бурой пятнистости у

Маниока съедобного (кассавы) *Manihot esculenta* международная группа ученых изучила влияние уровня аккумуляции миРНК в трансгенных растениях этого вида, которые содержат конструкцию двуцепочечной РНК, созданной на основе фрагментов генов белка оболочки из вируса коричневой полосатости маниоки (CBSB – Cassava brown streak virus) (Patatavirales: Potyviridae, *Ipomovirus*) и угандийского вируса коричневой полосатости маниоки (UCBSB – Ugandan cassava brown streak virus) (Patatavirales: Potyviridae, *Ipomovirus*), которые являются причиной этого заболевания. Нозерн-блот-анализ 169 независимых трансгенных линий выявил, что 57 линий (34 %) не показали обнаруживаемого накопления миРНК, 40 линий (24 %) показали относительно низкий уровень их содержания и 71 (42 %) линия трансгенных растений накапливала средний или высокий уровень миРНК по сравнению с контролем. Линии с низким уровнем накопления миРНК против вирусов были восприимчивы к обоим штаммам вирусов, тогда как среднее или высокое накопление миРНК у трансгенных линий кассавы придавало им высокий уровень устойчивости к фитопатогенам. Авторы исследования отмечают, что устойчивость кассавы к болезни бурой пятнистости в значительной мере растет с накоплением миРНК против вирусов, вызывающих эту болезнь [17].

Другой причиной различной устойчивости к вирусу может быть использование при создании конструкции в качестве мишени некритичной для жизнедеятельности вируса нуклеотидной последовательности. Так, исследователи из Японии трансформировали растения риса конструкциями двуцепочечной РНК против тениювируса полосатости риса (RSTV – Rice stripe tenuivirus) (Bunyavirales: Phenuiviridae, *Tenuivirus*), являющегося причиной серых некротических поражений у растения. В своей работе они применили несколько конструкций, направленных против различных участков генома этого вируса. В результате трансгенные растения, которые несут специфичную конструкцию против гена белка капсида (*pC3*) или гена белка передвижения (*pC4*) были устойчивыми к вирусной инфекции, в то время как трансгенные растения, которые содержат конструкции против генов *pC2* или *p4*, кодирующие гликопротеин неизвестной функции и крупный неструктурный белок неизвестной функции, соответственно, не показали устойчивости к вирусу [18].

Еще одним потенциальным недостатком подхода по индукции РНК-интерференции с помощью двуцепочечной РНК является феномен деградации нецелевых транскриптов. В результате транскрипции отдельных конструкций двуцепочечной РНК образуется множество малых интерферирующих РНК, которые помимо основной мишени потенциально могут поражать некоторые транскрипты генов самого растения, даже несмотря на неполную комплементарность. Например, растения томата (*Solanum lycopersicum* cv. Campbell-28), которые были трансформированы конструкцией двуцепочечной РНК против гена *C1* из вируса скручивания желтых листьев томата (TYLCV – Tomato yellow leaf curl virus) (Geplafuvirales: Geminiviridae, *Begomovirus*), показали устойчивость к вирусу, но имели незначительные фенотипические отклонения и аномалии в развитии. При сравнении транскриптомов трансгенных растений и растений дикого (нетрансформированного) типа было выявлено 70 дифференциально транскрибируемых генов, большинство из которых участвуют в процессах биологической регуляции, ответа на стимулы, а также в метаболических и клеточных процессах. Авторы связывают аномалии у трансгенных растений с феноменом деградации нецелевых транскриптов вследствие ненаправленного действия образующихся миРНК, однако это требует дополнительных исследований [19].

Формирование устойчивости к вирусам с помощью трансформации конструкцией искусственной микроРНК

Другим эффективным способом придания устойчивости к вирусам является трансформация растений конструкциями, содержащими предшественник искусственной

микроРНК, процесс создания которых подробно описан в работе [20]. В отличие от конструкций, продуцирующих миРНК, конструкции микроРНК продуцируют одну малую РНК длиной 21 нуклеотид с четко определенной нуклеотидной последовательностью, что обеспечивает сверхспецифичную деградацию целевого транскрипта в консервативном регионе. Конструкции микроРНК при правильном выборе мишени могут придавать устойчивость к вирусу, а также они менее подвержены эффекту неспецифической деградации, что потенциально делает данную конструкцию более биологически безопасной. Как и в случае трансформации конструкцией двуцепочечной РНК, конструкции на основе микроРНК можно использовать для создания устойчивости к одному или нескольким вирусам.

Например, растения томата, трансформированные искусственной микроРНК против гена *AC1* из вируса скручивания листьев томата Нью-Дели (ToLCNDV – Tomato leaf curl New Delhi virus) (Geplafuvirales: Geminiviridae, *Begomovirus*), демонстрировали высокий уровень устойчивости к этому вирусу [21]. В другом исследовании ученые из Китая применили данную технологию для придания устойчивости к Y-вирусу картофеля и X-вирусу картофеля у *Nicotiana tabacum*. В качестве мишеней были выбраны нуклеотидные последовательности белков-супрессоров этих вирусов, а именно *HC-Pro* у Y-вируса картофеля и *p25* у X-вируса картофеля. Трансгенные растения, транскрибирующие предшественник искусственной микроРНК против гена *HC-Pro* или *p25*, были устойчивы к заражению PVY или PVX, соответственно, тогда как растения, которые были трансформированы димерной конструкцией, показали устойчивость к обоим вирусам. Однако восприимчивость к вирусам наблюдалась у трансгенных растений при заражении штаммами вирусов, в которых содержались мутации в местах гибридизации искусственной микроРНК и вирусной РНК [22].

Помимо мутаций некоторые вторичные структуры нуклеотидных последовательностей вирусов делают их недоступными для белков РНК-интерференции. В работе Duan и коллег растения *A. thaliana* были трансформированы конструкциями микроРНК, направленными на высококонсервативную 3'-нетранслируемую область из вируса огуречной мозаики. Известно, что в этой области находится тРНК-подобная структура. В этой работе авторы показали, что конструкции микроРНК, не нацеленные на эту структуру, обеспечивали устойчивость к вирусу у *A. thaliana* [23].

Избежать вышеуказанных недостатков можно путем применения многокомпонентных конструкций, в которых используются несколько мишеней, относящихся к консервативным доменам вируса. Ученые из Австралии трансформировали пшеницу конструкцией, содержащей 5 предшественников искусственных микроРНК, мишенями которых являлись консервативные домены вируса полосатой мозаики пшеницы (WSMV – Wheat streak mosaic virus) (Patatavirales: Potyviridae, *Tritimovirus*), вызывающего тяжелые поражения у растений пшеницы. В результате данного подхода были получены трансгенные линии пшеницы, обладающие высоким уровнем устойчивости к вирусу [24].

Формирование устойчивости к вирусам с помощью обработки растений двуцепочечной РНК

Преимущество создания трансгенных растений заключается в том, что их устойчивость сохраняется на протяжении жизни и может наследоваться. Однако получение трансгенных растений является долгим процессом. Внешняя обработка синтезированной *in vitro* или *in vivo* двуцепочечной РНК может стать альтернативным способом предотвращения развития вирусных заболеваний у растений.

Например, обработка синтезированной *in vitro* двуцепочечной РНК против вируса пятнистого увядания томатов может быть эффективным подходом для придания растениям табака устойчивости к этому вирусу [25]. Авторы данной работы обрабатывали растения *Nicotiana benthamiana* и томата двумя конструкциями двуцепочечной РНК, синтезированной на основе гена нуклеокапсида (*N*) или гена белка передвижения (*NSm*).

Большинство растений, обработанных двуцепочечной РНК против гена *N*, не проявляли симптомов вирусного заболевания в течение всего эксперимента (40 дней после инфекции у *N. benthamiana*, 63 дня у томата). Однако обработка конструкцией против гена *NSm* не приводила к устойчивости, хотя растения показывали более слабые симптомы по сравнению с необработанными растениями. Таким образом, как и в случае трансформации конструкцией двуцепочечной РНК или микроРНК, при внешней обработке двуцепочечной РНК выбор «мишени» у вируса является решающим для создания устойчивости к вирусам.

Одним из недостатков внешней обработки двуцепочечной РНК является короткий срок длительности эффекта устойчивости к вирусам, в результате чего повторное вирусное заражение может «пробить» защиту растения. Так, обработка двуцепочечной РНК против гена репликазы из вируса мягкой пятнистости перца (РММoV – Pepper mild mottle virus) (Martellivirales: Virgaviridae, *Tobamovirus*) обеспечивает устойчивость к вирусу у гороха. Однако повторная инфекция вирусом через 20 дней после обработки приводит к появлению симптомов [26]. Данный недостаток обусловлен деградацией двуцепочечной РНК и может быть компенсирован применением различных модификаций в обработке. Например, загрузка двуцепочечной РНК в наночастицы на основе слоистого двойного гидроксида (BioClay) значительно повышает эффективность обработки, приводя к отсутствию симптомов у гороха при повторной инфекции вирусом мягкой пятнистости перца через 20 дней после обработки. Нозерн-блот-анализ показывает, что BioClay защищает двуцепочечную РНК от деградации РНКазой [26].

Ключевым недостатком обработки *in vitro* синтезированной двуцепочечной РНК является ее дороговизна. Цена синтеза 1 мг двуцепочечной РНК при помощи коммерчески доступных наборов реактивов для лабораторных исследований достигает 50 тыс. руб., что экономически нецелесообразно для придания устойчивости к вирусам в полях. Альтернативой *in vitro* синтеза является биосинтез двуцепочечной РНК *in vivo*. Например, двуцепочечная РНК может нарабатываться в больших количествах в бактериях *Escherichia coli* штамма HT115, в котором подавлена транскрипция гена РНКазы. Обработка растений табака *N. benthamiana* экстрактами из *E. coli* HT115, транскрибирующей «шпилечную» конструкцию двуцепочечной РНК против вируса мягкой пятнистости перца или вируса оспы сливы, обеспечивает устойчивость табака к соответствующим вирусам [27].

Заключение

Вирусы являются причиной существенных потерь урожая сельскохозяйственных культур растений во всем мире. Биотехнологии, направленные на повышение устойчивости растений посредством индукции РНК-интерференции, показали себя перспективными инструментами для борьбы с различными вирусами растений и требуют дальнейшего изучения. В настоящее время на базе лабораторий биотехнологии и вирусологии в ФНИЦ Биоразнообразия ДВО РАН зарождается направление по исследованию механизма РНК-интерференции и применению подходов по ее индукции для создания ценных культурных растений, устойчивых к вирусным заболеваниям, которые представляют угрозу для Дальнего Востока России. Создание культур, устойчивых к вирусным инфекциям, является одной из задач для перехода к высокопродуктивному и экологически чистому агрохозяйству.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Jones R.A.C. Global plant virus disease pandemics and epidemics: 2. // *Plants*. 2021. Vol. 10, № 2. P. 233.
2. Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору. Национальный доклад о карантинном фитосанитарном состоянии территории Российской Федерации в 2020 году. Министерство сельского

хозяйства Российской Федерации. – <https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/usefulinf/files/nd2021.pdf> (дата обращения: 11.04.2022).

3. Толкач В.Ф., Какарека Н.Н., Волков Ю.Г., Козловская З.Н., Сапоцкий М.В., Плешакова Т.И., Дьяконов К.П., Щелканов М.Ю. Вирусные болезни овощных и бахчевых сельскохозяйственных культур на юге Дальнего Востока // Юг России: экология, развитие. 2019. Т. 14, № 4. С. 121–133.
4. Какарека Н.Н., Волков Ю.Г., Сапоцкий М.В., Толкач В.Ф., Щелканов М.Ю. Вирусы злаковых культур и их переносчики на юге российского Дальнего Востока // Сельскохозяйственная биология. 2020. Т. 55, № 3. С. 439–450.
5. Какарека Н.Н., Волков Ю.Г., Толкач В.Ф., Табакаева Т.В., Белов Ю.А., Муратов А.А., Щелканов М.Ю. Вирусные болезни бобовых культур на юге российского Дальнего Востока // Юг России: экология, развитие. 2021. Т. 16, № 4. С. 71–85.
6. Deleris A., Gallego-Bartolome J., Bao J., Kasschau K.D., Carrington J.C., Voinnet O. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-Like Proteins in antiviral defense // Science. 2006. Vol. 313, N 5783. P. 68–71.
7. Carbonell A., Carrington J.C. Antiviral roles of plant ARGONAUTES // Current Opinion in Plant Biology. 2015. Vol. 27. P. 111–117.
8. Zhang B., Pan X., Cobb G.P., Anderson T.A. Plant microRNA: A small regulatory molecule with big impact // Developmental Biology. 2006. Vol. 289, N 1. P. 3–16.
9. Duan C.G., Fang Y.Y., Zhou B.J., Zhao J.H., Hou W.N., Zhu H., Ding S.W., Guo H.S. Suppression of *Arabidopsis* ARGONAUTE1-mediated slicing, transgene-induced RNA silencing, and DNA methylation by distinct domains of the *Cucumber mosaic virus* 2b protein // The Plant Cell. 2012. Vol. 24, N 1. P. 259–274.
10. Li F., Wang A. RNA-targeted antiviral immunity: more than just RNA silencing // Trends in Microbiology. 2019. Vol. 27, № 9. P. 792–805.
11. Sidorova T., Mikhailov R., Pushin A., Miroshnichenko D., Dolgov S. Agrobacterium-mediated transformation of Russian commercial plum cv. “Startovaya” (*Prunus domestica* L.) with virus-derived hairpin RNA construct confers durable resistance to PPV infection in mature plants // Frontiers in Plant Science. 2019. Vol. 10. P. 286.
12. Leibman D., Ortega-Parra N., Wolf D., Shterkman M., Hanssen I., Gal-On A. A transgenic RNAi approach for developing tomato plants immune to *Pepino mosaic virus* // Plant Pathology. 2021. Vol. 70, N 4. P. 1003–1012.
13. Ahmed M.M.S., Bian S., Wang M., Zhao J., Zhang B., Liu Q., Zhang C., Tang S., Gu M., Yu H. RNAi-mediated resistance to *Rice black-streaked dwarf virus* in transgenic rice // Transgenic Research. 2017. Vol. 26, N 2. P. 197–207.
14. Hameed A., Tahir M.N., Asad S., Bilal R., Eck J.V., Jander G., Mansoor S. RNAi-mediated simultaneous resistance against three RNA viruses in potato // Molecular Biotechnology. 2017. Vol. 59, N 2–3. P. 73–83.
15. Gao L., Ding X., Li K., Liao W., Zhong Y., Ren R., Liu Z., Adhimooolam K., Zhi H. Characterization of *Soybean mosaic virus* resistance derived from inverted repeat-SMV-HC-Pro genes in multiple soybean cultivars // Theoretical and Applied Genetics. 2015. Vol. 128, N 8. P. 1489–1505.
16. Zhu C.X., Song Y.Z., Yin G.H., Wen F.J. Induction of RNA-mediated multiple virus resistance to *Potato virus Y*, *Tobacco mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus* // Journ. of Phytopathology. 2009. Vol. 157, N 2. P. 101–107.
17. Beyene G., Chauhan R.D., Ilyas M., Wagaba H., Fauquet C.M., Miano D., Alicai T., Taylor N.J. A Virus-derived stacked RNA construct confers robust resistance to cassava brown streak disease // Frontiers in Plant Science. 2017. Vol. 7. P. 2052.
18. Shimizu T., Nakazono-Nagaoka E., Uehara-Ichiki T., Sasaya T., Omura T. Targeting specific genes for RNA interference is crucial to the development of strong resistance to *Rice stripe virus* // Plant Biotechnology Journ. 2011. Vol. 9, N 4. P. 503–512.
19. Fuentes A., Carlos N., Ruiz Y., Callard D., Sanchez Y., Ochagavia M.E., Seguin J., Malpica-Lopez N., Hohn T., Lecca M.R., Pérez R., Doreste V., Rehrauer H., Farinelli L., Pujol M., Pooggin M.M. Field trial and molecular characterization of RNAi-transgenic tomato plants that exhibit resistance to *Tomato yellow leaf curl geminivirus* // Molecular Plant-Microbe Interactions. 2016. Vol. 29, N 3. P. 197–209.
20. Ossowski S., Schwab R., Weigel D. Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs // The Plant Journ. 2008. Vol. 53, N 4. P. 674–690.
21. Sharma N., Prasad M. Silencing *AC1* of *Tomato leaf curl virus* using artificial microRNA confers resistance to leaf curl disease in transgenic tomato // Plant Cell Reports. 2020. Vol. 39, N 11. P. 1565–1579.
22. Ai T., Zhang L., Gao Z., Zhu C.X., Guo X. Highly efficient virus resistance mediated by artificial microRNAs that target the suppressor of PVX and PVY in plants // Plant Biology. 2011. Vol. 13, N 2. P. 304–316.
23. Duan C.G., Wang C.H., Fang R.X., Guo H.S. Artificial microRNAs highly accessible to targets confer efficient virus resistance in plants // Journ. of Virology. 2008. Vol. 82, N 22. P. 11084–11095.
24. Fahim M., Millar A.A., Wood C.C., Larkin P.J. Resistance to *Wheat streak mosaic virus* generated by expression of an artificial polycistronic microRNA in wheat // Plant Biotechnology Journ. 2012. Vol. 10, N 2. P. 150–163.
25. Tabein S., Jansen M., Noris E., Vaira A.M., Marian D., Behjatnia S.A.A., Accotto G.P., Miozzi L. The induction of an effective dsRNA-mediated resistance against *Tomato spotted wilt virus* by exogenous application of double-stranded RNA largely depends on the selection of the viral RNA target region // Frontiers in Plant Science. 2020. Vol. 11. P. 533338.
26. Mitter N., Worrall E.A., Robinson K.E., Li P., Jain R.G., Taochy C., Fletcher S.J., Carroll B.J., Lu G.Q., Xu Z.P. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses // Nature Plants. 2017. Vol. 3, N 2. P. 16207.

27. Tenllado F., Martinez-Garcia B., Vargas M., Diaz-Ruiz J. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections // BMC Biotechnology. 2003. Vol. 3. P. 3.

REFERENCES

1. Jones R.A.C. Global plant virus disease pandemics and epidemics. *Plants*. 2021;10(2):233.
2. Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance. Natsional'nyi doklad o karantinnom fitosanitar-nom sostoyanii territorii Rossiiskoi Federatsii v 2020 godu = [National report on the quarantine phytosanitary status of the territory of the Russian Federation in 2020]. Ministry of Agriculture of the Russian Federation. (In Russ.). Available from: <https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/usefulinf/files/nd2021.pdf>.
3. Tolkach V.F., Kakareka N.N., Volkov Y.G., Kozlovskaya Z.N., Sapotskiy M.V., Pleshakova T.I., D'yakov K.P., Shchelkanov M.Y. Virus diseases of vegetable and melon crops in the south of the Russian Far East. *South of Russia: ecology, development*. 2019;14(4):121-133. (In Russ.).
4. Kakareka N.N., Volkov Y.G., Sapotskiy M.V., Tolkach V.F., Shchelkanov M.Y. Viruses of cereal crops and their vectors in the south of the Russian Far East (review). *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya = [Agricultural Biology]*. 2020;55(3):439-450. (In Russ.).
5. Kakareka N.N., Volkov Y.G., Tolkach V.F., Tabakaeva T.V., Belov Y.A., Muratov A.A., Shchelkanov M.Y. Viral diseases of legumes in the south of the Russian Far East. *South of Russia: ecology, development*. 2021;16(4):71-85. (In Russ.).
6. Deleris A., Gallego-Bartolome J., Bao J., Kasschau K.D., Carrington J.C., Voinnet O. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-Like Proteins in antiviral defense. *Science*. 2006;313(5783):68-71.
7. Carbonell A., Carrington J.C. Antiviral roles of plant ARGONAUTES. *Current Opinion in Plant Biology*. 2015;27:111-117.
8. Zhang B., Pan X., Cobb G.P., Anderson T.A. Plant microRNA: A small regulatory molecule with big impact. *Developmental Biology*. 2006;289(1):3-16.
9. Duan C.G., Fang Y.Y., Zhou B.J., Zhao J.H., Hou W.N., Zhu H., Ding S.W., Guo H.S. Suppression of *Arabidopsis* ARGONAUTE1-mediated slicing, transgene-induced RNA silencing, and DNA methylation by distinct domains of the *Cucumber mosaic virus 2b* protein. *The Plant Cell*. 2012;24(1):259-274.
10. Li F., Wang A. RNA-targeted antiviral immunity: more than just RNA silencing. *Trends in Microbiology*. 2019;27(9):792-805.
11. Sidorova T., Mikhailov R., Pushin A., Miroshnichenko D., Dolgov S. Agrobacterium-mediated transformation of Russian commercial plum cv. "Startovaya" (*Prunus domestica* L.) with virus-derived hairpin RNA construct confers durable resistance to PPV infection in mature plants. *Frontiers in Plant Science*. 2019;10:286.
12. Leibman D., Ortega-Parra N., Wolf D., Shterkman M., Hanssen I., Gal-On A. A transgenic RNAi approach for developing tomato plants immune to *Pepino mosaic virus*. *Plant Pathology*. 2021;70(4):1003-1012.
13. Ahmed M.M.S., Bian S., Wang M., Zhao J., Zhang B., Liu Q., Zhang C., Tang S., Gu M., Yu H. RNAi-mediated resistance to *Rice black-streaked dwarf virus* in transgenic rice. *Transgenic Research*. 2017;26(2):197-207.
14. Hameed A., Tahir M.N., Asad S., Bilal R., Eck J.V., Jander G., Mansoor S. RNAi-mediated simultaneous resistance against three RNA viruses in potato. *Molecular Biotechnology*. 2017;59(2-3):73-83.
15. Gao L., Ding X., Li K., Liao W., Zhong Y., Ren R., Liu Z., Adhimoalam K., Zhi H. Characterization of *Soybean mosaic virus* resistance derived from inverted repeat-SMV-HC-Pro genes in multiple soybean cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*. 2015;128(8):1489-1505.
16. Zhu C.X., Song Y.Z., Yin G.H., Wen F.J. Induction of RNA-mediated multiple virus resistance to *Potato virus Y*, *Tobacco mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus*. *Journal of Phytopathology*. 2009;157(2):101-107.
17. Beyene G., Chauhan R.D., Ilyas M., Wagaba H., Fauquet C.M., Miano D., Alicai T., Taylor N.J. A virus-derived stacked RNA construct confers robust resistance to Cassava brown streak disease. *Frontiers in Plant Science*. 2017;7:2052.
18. Shimizu T., Nakazono-Nagaoka E., Uehara-Ichiki T., Sasaya T., Omura T. Targeting specific genes for RNA interference is crucial to the development of strong resistance to *Rice stripe virus*. *Plant Biotechnology Journal*. 2011;9(4):503-512.
19. Fuentes A., Carlos N., Ruiz Y., Callard D., Sanchez Y., Ochagavia M.E., Seguin J., Malpica-Lopez N., Hohn T., Lecca M.R., Perez R., Doreste V., Rehrauer H., Farinelli L., Pujol M., Pooggin M.M. Field trial and molecular characterization of RNAi-transgenic tomato plants that exhibit resistance to *Tomato yellow leaf curl geminivirus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2016;29(3):197-209.
20. Ossowski S., Schwab R., Weigel D. Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *The Plant Journal*. 2008;53(4):674-690.
21. Sharma N., Prasad M. Silencing *AC1* of *Tomato leaf curl virus* using artificial microRNA confers resistance to leaf curl disease in transgenic tomato. *Plant Cell Reports*. 2020;39(11):1565-1579.
22. Ai T., Zhang L., Gao Z., Zhu C.X., Guo X. Highly efficient virus resistance mediated by artificial microRNAs that target the suppressor of PVX and PVY in plants. *Plant Biology*. 2011;13(2):304-316.

23. Duan C.G., Wang C.H., Fang R.X., Guo H.S. Artificial microRNAs highly accessible to targets confer efficient virus resistance in plants. *Journal of Virology*. 2008;82(22):11084-11095.
24. Fahim M., Millar A.A., Wood C.C., Larkin P.J. Resistance to *Wheat streak mosaic virus* generated by expression of an artificial polycistronic microRNA in wheat. *Plant Biotechnology Journal*. 2012;10(2):150-163.
25. Tabein S., Jansen M., Noris E., Vaira A.M., Marian D., Behjatnia S.A.A., Accotto G.P., Miozzi L. The induction of an effective dsRNA-mediated resistance against *Tomato spotted wilt virus* by exogenous application of double-stranded RNA largely depends on the selection of the viral RNA target region. *Frontiers in Plant Science*. 2020;11:533338.
26. Mitter N., Worrall E.A., Robinson K.E., Li P., Jain R.G., Taochy C., Fletcher S.J., Carroll B.J., Lu G.Q., Xu Z.P. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nature Plants*. 2017;3(2):16207.
27. Tenllado F., Martinez-Garcia B., Vargas M., Diaz-Ruiz J. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. *BMC Biotechnology*. 2003;3:3.