

УДК 581.1

ИЗОЛЯЦИЯ CP-PVY-СПЕЦИФИЧНЫХ siRNA ИЗ PVY-ИНФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ *Solanum tuberosum*

© 2023 г. М. Ю. Сутула^а, *, Ж. К. Кабатаева^а,
Г. К. Комекова^а, Т. С. Хоснутдинова^а, Е. А. Жакманова^а

^аНекоммерческое акционерное общество “Восточно-Казахстанский
университет имени Сарсена Аманжолова”, Усть-Каменогорск, Казахстан

*e-mail: max.sutula@gmail.com

Поступила в редакцию 08.12.2022 г.

После доработки 13.12.2022 г.

Принята к публикации 15.12.2022 г.

Инструменты для активации резистентности сельскохозяйственных культур к вирусам в настоящее время становятся частью комплексной стратегии защиты растений. Искусственная устойчивость к вирусам посредством экспрессии белка оболочки вируса в трансгенных растениях довольно хорошо изучена. Актуальным вопросом является изучение малых РНК, вовлеченных в защитные механизмы РНК-интерференции против вирусов. Понимание роли коротких интерферирующих РНК (siRNA) в регуляции и выключении генов имеет важное значение. Вспомогательный компонент протеиназы (НС-Pro) – мультифункциональный супрессорный белок, синтезируемый вирусом картофеля Y, способен нейтрализовать защиту растений *S. tuberosum* путем захвата siRNA и выведения их из процесса РНК-интерференции, тем самым вызывая системное заражение растения-хозяина. Жидкостная хроматография белков в сочетании с высокоэффективным секвенированием может помочь в распознавании большого количества малых РНК, образующихся в результате деградации вирусной РНК, и идентифицировать 21–23 п.н. siRNA из PVY-инфицированных растений *S. tuberosum*. Нуклеопротеиновый комплекс НС-Pro/siRNA обнаружен в хроматографических фракциях с помощью антител против НС-Pro, Southern-blot указывал на наличие малых РНК в комплексе, а анализ данных глубокого секвенирования популяции малых РНК определил специфичность 21–23 п.н. siRNA к белку оболочки вируса PVY. Результаты исследований могут быть применимы в изучении внутриклеточных сигнальных молекул и стимулировать новые исследования противовирусных механизмов для разработки эффективных стратегий защиты растений от вирусов.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum* L., вирусы, выделение siRNA, PVY, sRNA

DOI: 10.31857/S0015330322600711, **EDN:** IBNXFM

ВВЕДЕНИЕ

Фитопатогенные вирусы наносят огромный ущерб сельскому хозяйству и экономике [1]. Из-за распространения вирусов картофеля потери урожая могут достигать 60% [2]. Существующие методы борьбы с вирусами сводятся к получению безвирусного семенного материала и своевременной диагностике вирусных инфекций. Однако работа по контролю вирусных инфекций осложняется тем, что каждый сезон появляется новый вирусный штамм, а патогенез вирусной инфекции длительное время протекает в скрытой форме. В связи с этим, особенно актуальны работы по разработке актуальных стратегий борьбы с вирусами и созданию устойчивых линий растений.

Одним из потенциальных инструментов повышения устойчивости растений к вирусам является РНК-интерференция (RNA-i) [3]. Существенной особенностью защитного механизма РНК-

интерференции является наличие коротких двуцепочечных интерферирующих РНК длиной 21–23 нуклеотид, которые являются мощными модуляторами РНК-интерференции [4, 5]. При запуске процесса RNA-i, двуцепочечная РНК вируса (dsRNA) с помощью фермента DISER (рибонуклеаза из семейства РНКазы III) фрагментируется на комплементарные вирусной РНК короткие интерферирующие РНК, которые в дальнейшем вовлекаются в эндорибонуклеазный эффекторный комплекс RISC (RNA-induced silencing complex) и напрямую участвуют в распознавании и последующей деградации вирусных РНК-мишеней [6, 7]. Исследователи продемонстрировали, как используя феномен защитной РНК-интерференции можно придать значительную устойчивость к вирусам путем создания генетически модифицированных растений [8]. В нашей работе наглядно показан принципиально новый методо-

логический подход изоляции специфичных к белку оболочки вируса PVY (coat protein, CP) 21–23 п.н. siRNA из PVY-инфицированных растений [9].

Вирусы из рода *Potyviridae* кодируют супрессорный белок HC-Pro (Helper component-proteinase), который является многофункциональным вирусным белком и принимает участие в таких важных процессах, как репликация вируса, системное и межклеточное распространение вирусных частиц [10]. Наиболее важной биологической функцией HC-Pro является его участие в подавлении защитных механизмов RNA-i, в частности, в захвате и удержании коротких 21–23 п.н. молекул siRNA, необходимых для успешной активации защитных механизмов RNA-i. Детальные биохимические исследования HC-Pro показали, что его способность образовывать димеры и мультимеры имеет принципиально важное значение для функционирования в качестве супрессора RNA-i. Исследователи определили функциональную роль сайта FRNK в структуре белка HC-Pro и показали, что эта функция напрямую влияет на селективное связывание siRNA и интенсивность проявления симптомов вирусного заболевания [11]. Кроме того, супрессорная функция HC-Pro также может быть связана со снижением стабильности siRNA, поскольку трансгенная экспрессия белка приводит к значительному снижению 5'-концевой модификации вирусных 21-нуклеотидных siRNA. Также, было обнаружено, что HC-Pro ингибирует функциональное метилирование siRNA и связывание siRNA с эффекторным комплексом RISC [12].

Поскольку структурные и биохимические характеристики супрессорного белка HC-Pro играют решающую роль в обнаружении и стабилизации siRNA на поверхности субъединиц супрессорного белка HC-Pro, образовавшийся комплекс HC-Pro/siRNA в PVY-инфицированных растениях может послужить источником вирус-специфичных коротких интерферирующих РНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали растения картофеля (*Solanum tuberosum L.*), семейство Пасленовые (*Solanaceae*), сорта Изольда и Таврия (класс Элита).

Растения выращивали на жидкой питательной МС-среде [13] в специальной вегетационной камере при влажности воздуха 85%, температуре 19–20°C и 16-часовом световом периоде. После выращивания в ростовой камере, микрорастения были высажены на территории сада Восточно-Казхстанской сельскохозяйственной опытной станции (GPS: N50.03324°, E82.53346°). В каждом эксперименте использовали 60 растений каждого сорта и проводили 3 биологические повторности в одинаковых условиях.

ELISA и RT-PCR диагностика

Диагностику инфекционных заболеваний картофеля (PVY, PVS, PVM, PVX, PLRV) проводили по протоколу коммерческого тест-набора сэндвич-варианта ELISA Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Федеральный исследовательский центр картофеля имени А.Г. Лорха”, Россия. Результаты проведения анализа учитывали на спектрофотометре Multiskan FC (“Thermo Scientific”, США) при длине волны 492 нм.

Нуклеиновые кислоты из растительного материала экстрагировали с помощью коммерческого набора М-СОРБ (“Синтол”, Россия) с использованием магнитных частиц. Одностадийную реакцию обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) проводили с использованием коммерческого набора реагентов (“Синтол”, Россия) на ПЦР-анализаторе АНК-32 (“Синтол”, Россия). Образцы проверяли на наличие вирусов PVY, PVS, PVM, PVX, PLRV.

Фракционирование комплекса HC-Pro/siRNA методом колоночной гель-фильтрации

Для проведения жидкостной хроматографии белков (Fast protein liquid chromatography, FPLC) 6 г свежего листового материала зараженных вирусом PVY растений *S. tuberosum*, замораживали жидким азотом (–196°C) и растирали пестиком в фарфоровой ступке до гомогенной массы. К полученному гомогенату добавляли экстракционный буфер в объеме 1 мл (200 мМ Трис-НСl, pH 7.4). Экстракты фильтровали и центрифугировали в течение 15 мин при 12000 g и 4°C. Супернатант загружали на колонку (объем 150 мл, длиной 0.2 м) и фракционировали на FPLC-установке АКТА pure 25 (“GE Healthcare”, США) через колонку с сефакрилом S-200 (“Sigma”, США) со скоростью 50 мл/ч. В качестве подвижной фазы использовали буфер 100 мМ Tris-НСl (pH 7.5). Анализ концентрации белков в элюате проводили при длине волны A280 нм. С помощью декстрана – 1000 кДа (“Sigma”, США) определяли свободный объем колонки $V_0 = 14$ мл. Калибровку проводили с использованием маркерных белков: алкогольдегидрогеназа – 150 кДа, бычий сывороточный альбумин – 68 кДа, карбоангидраза – 40 кДа и цитохром – 12 кДа. (“Sigma”, США). Фракции объемом 1.5 мл собирали с помощью автоматического коллектора с последующим переносом на лед [14].

Выделение и очистка комплекса HC-Pro/siRNA

Комплекс HC-Pro/siRNA из фракций очищали с помощью anti-rabbit Protein-G агарозы, согласно прилагаемой к коммерческому набору методике (“Thermo Scientific”, США). Фракции смешивали с антителами (anti-rabbit) и инкубировали 12 ч при 4°C. Затем в каждую пробирку прилива-

ли по 30 мкл Protein-G и инкубировали 2 ч при комнатной температуре. После инкубации к смеси добавляли 500 мкл буфера для иммунопреципитации, центрифугировали в течение 3 мин и удаляли супернатант. Этап осаждения повторяли троекратно. Иммунный комплекс выделяли путем добавления 50 мкл буфера для элюции, инкубации 5 мин и центрифугирования при 2500 g в течение 3 мин.

Изоляция siRNA

Нуклеиновые кислоты из хроматографических фракций, содержащих комплекс HC-Pro/siRNA, выделяли модифицированным методом с использованием стабилизированного раствора фенола и TRI-реагента ("Sigma", США) [15]. Образцы последовательно смешивали с TRI-реагентом, хлороформом, изопропанолом (99.9%), этанолом (70%) и поэтапно выдерживали 5 мин при комнатной температуре с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 12000 g и 4°C. Осадок высушивали на льду и разбавляли MilliQ-дистиллированной водой, свободной от ферментов.

Концентрацию РНК определяли на спектральном анализаторе NanoDrop 2000c ("Thermo Scientific", США) при длине волны A260 нм. Чистоту препарата анализировали в соотношении оптической плотности при длинах волн A260/280 нм.

Секвенирование коротких интерферирующих РНК

Образцы sRNA подготавливали к высокоэффективному секвенированию (HTS) по протоколу Illumina ("Illumina Inc.", США). sRNA лигировали с 3'- и 5'-адаптером. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием 10 мкл образцов РНК и обратной транскриптазы SuperScript III ("Invitrogen Corp.", США) в соответствии с инструкцией производителя. Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для амплификации. После амплификации ДНК фракционировали в 8% полиакриламидном геле при 200 В в течение 40 мин и тестировали на чипе Agilent 2100 Bioanalyzer ("Agilent Technologies Inc.", США). Полученную библиотеку кластеризовали и секвенировали с помощью анализатора генома Illumina HiX ("Illumina Inc.", США) в соответствии с инструкцией производителя в течение 35 циклов.

Данные секвенирования проверяли на соответствие и сортировали по распространенности. Дублирующиеся последовательности были удалены. Из оставшихся последовательностей были отобраны 100 наиболее часто встречающихся последовательностей и проанализированы путем сравнения с нуклеиновой последовательностью coat protein PVY в BLASTN на идентичность с использованием алфавитной сортировки и таксонометрической идентификации для *Solanum*.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Использование PVY-инфицированных растений в качестве источника специфичных к вирусу коротких интерферирующих РНК

Как известно, одной из основных функций супрессорного белка HC-Pro является размер-специфичный захват и фиксация sRNA на поверхности субъединиц белка [16]. Мы обнаружили в клеточных экстрактах PVY-инфицированных растений картофеля специфичные к вирусу короткие интерферирующие РНК, связанные с HC-Pro. Вирус-специфичные siRNA были получены путем очистки и диссоциации комплекса HC-Pro/siRNA из тканей растений, инфицированных PVY. С целью предотвращения контаминации образцов другими вирусами картофеля, нами была проведена комбинированная диагностика экспериментальных растений на наличие распространенных в Казахстане вирусов данной культуры.

По результатам диагностики ELISA и RT-PCR были отобраны образцы растений с подтвержденной моноинфекцией PVY: Изольда 2, Изольда 3, Изольда 5, Таврия 2, Таврия 5 (табл. 1). Экстракты растительного материала PVY-инфицированных образцов картофеля были фракционированы методом гель-фильтрационной хроматографии на колонке с сефакрилом S-200. Данная матрица была выбрана, поскольку разрешающая способность сефакрила S-200 позволяет эффективно разделять белки с мол. м. до 200 кДа. FPLC-фракции после хроматографического разделения анализировали на наличие белков и нуклеиновых кислот (рис. 1а). При помощи anti-HC-Pro поликлональной кроличьей сыворотки были идентифицированы фракции с мол. м. 60 кДа, содержащие белок-супрессор HC-Pro, связанный с siRNA (рис. 1б). Из хроматографических фракций комплекс HC-Pro/siRNA был осажден с помощью Protein-G агарозы, после чего короткие РНК из комплекса HC-Pro/siRNA были изолированы с помощью тризола, фенол-хлороформа и метанола. В результате siRNA отделились от супрессорного белка HC-Pro без каких-либо структурных повреждений и потерь специфичности.

Спектральный анализ подтвердил наличие нуклеиновых кислот во фракциях 3–5, эквивалентных мол. м. комплекса HC-Pro/siRNA 60 кДа (рис. 1) [10, 16]. Концентрация РНК в очищенных препаратах определена в пределах 120–210 нг/мкл. Southern blot показал наличие коротких молекул РНК длиной 21–23 нуклеотида в хроматографических фракциях, содержащих вирусный супрессор HC-Pro (рис. 1б). После 3 независимых повторов FPLC, выделения и очистки комплекса HC-Pro/siRNA и изоляции sRNA комплекс HC-Pro/siRNA всегда обнаруживался во фракциях, соответствующих мол. м. 60 кДа. Весь пул изолированных siRNA после серии процедур по

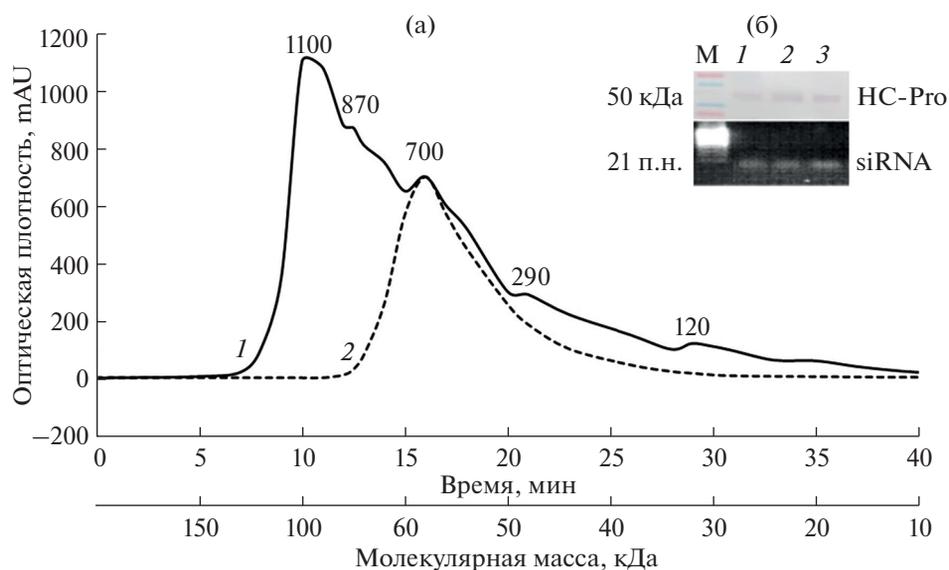


Рис. 1. Выделение и идентификация компонентов нуклеопротеинового комплекса HC-Pro/siRNA из PVY-инфицированных растений картофеля. **(а)** FPLC-хроматограмма профиля элюции белков, выделенных из образцов PVY-инфицированных растений. 1 – основной профиль элюции; 2 – элюция комплекса HC-Pro/siRNA (60 ± 5 кДа). **(б)** Western blot (сверху) с anti-HC-Pro поликлональной кроличьей сывороткой для идентификации комплекса HC-Pro/siRNA; Southern blot (снизу) для идентификации 21–23 п.н. sRNA. М – молекулярный маркер, цифрами отмечены номера FPLC-фракций. Примечание: было проведено 3 независимых повтора эксперимента. Комплекс HC-Pro/siRNA всегда обнаруживался во фракциях, эквивалентных мол. м. 60 кДа.

Таблица 1. Результаты ИФА и ПЦР диагностики сортов Изольда и Таврия на наличие вирусов картофеля

Сортообразец	Анализ образцов методом ИФА на наличие вирусов, ед. поглощения (AU, n=3)					Анализ образцов методом ОТ-ПЦР-РВ на наличие вирусов, порог цикла (Ct, n=3)					
	PLRV	PVM	PVS	PVX	PVY	PLRV	PVM	PVS	PVX	PVY	
Изольда 2	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos 1.688 ± 0.027	N/a	N/a	N/a	N/a	N/a	Pos 21.70 ± 0.1
Изольда 3	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos 1.372 ± 0.031	N/a	N/a	N/a	N/a	N/a	Pos 19.62 ± 0.1
Изольда 5	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos 1.372 ± 0.037	N/a	N/a	N/a	N/a	N/a	Pos 19.67 ± 0.3
Таврия 2	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos 1.042 ± 0.030	N/a	N/a	N/a	N/a	N/a	Pos 27.24 ± 0.1
Таврия 5	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos 1.663 ± 0.027	N/a	N/a	N/a	N/a	N/a	Pos 25.80 ± 0.2
Положительный контроль	1.195 ± 0.039	0.901 ± 0.025	0.889 ± 0.029	1.118 ± 0.034	1.047 ± 0.031	14.23 ± 0.1	17.10 ± 0.1	15.15 ± 0.1	16.20 ± 0.1	16.70 ± 0.1	
Отрицательный контроль	0.067 ± 0.018	0.091 ± 0.021	0.068 ± 0.025	0.052 ± 0.020	0.089 ± 0.017	N/a	N/a	N/a	N/a	N/a	N/a

Примечание: было проведено 3 независимых биологических повтора эксперимента. Значение представляет собой среднее ± стандартная ошибка среднего. N/a (no amplification) – нет амплификации, результат отрицательный. Pos – положительный, Neg – отрицательный. Были отобраны образцы, содержащие моноинфекцию PVY (Изольда 2, Изольда 3, Изольда 5, Таврия 2, Таврия 5).

Таблица 2. Идентификация CP-PVY siRNA в образцах листьев картофеля сортов Таврия и Изольда, инфицированных вирусом PVY

Сортообразец	Количество прочтений	21-п.н. РНК	miRNA	CP-PVY siRNA
Изольда 2	1 342 011	22	12	6
Изольда 3	856215	14	17	4
Изольда 5	1784321	7	10	7
Таврия 2	2410094	3	5	2
Таврия 5	1982016	18	11	2

Примечание: sRNA были изолированы из FPLC-фракций, содержащих HC-Pro/sRNA комплекс.

Таблица 3. Нуклеотидные последовательности CP-PVY siRNA

Последовательность	Количество прочтений	Длина	Начало	Конец	Цепь
GATAAGGATGTGAATGCTGGT	4839	21 п.н.	101	121	Положительная
TAAGGATGTGAATGCTGGTAC	7901	21 п.н.	103	123	Положительная
GGCATTCTCATTTTGGACGTG	3428	21 п.н.	180	160	Отрицательная
GAGAAACTGAGATGCCAACTG	14762	21 п.н.	321	341	Положительная
TGCCAACTGTGATGAATGGGC	39016	21 п.н.	333	353	Положительная
GTTTAATTCGAAATCTGCGGG	6109	21 п.н.	564	564	Положительная
TCGAGGTTGGGCTGATTCAA	27330	21 п.н.	683	703	Отрицательная

выделению и очистке комплекса HC-Pro/siRNA из растений, инфицированных PVY, был подвергнут глубокому секвенированию.

Высокопроизводительное секвенирование подтверждает наличие специфичных к белку оболочки вируса PVY коротких интерферирующих РНК в комплексе HC-Pro/siRNA

Последовательности нуклеотидов анализировали на наличие CP-PVY siRNA с помощью высокопроизводительного секвенирования. Секвенирование коротких РНК, изолированных из FPLC-фракций, содержащих комплекс HC-Pro/siRNA, после хроматографии образцов листьев картофеля сортов Таврия и Изольда показало от 1342011 до 2410094 прочтений. Для детального анализа были выбраны 50 лучших прочтений длиной от 19 до 24 оснований и от 3428 до 251090 прочтений для одной последовательности. Полученные последовательности были отсортированы в алфавитном порядке и проанализированы с помощью BLASTN на идентичность последовательности CP-PVY.

После удаления коротких (менее 20 оснований), более длинных sRNA (более 23 оснований) и больших наборов перекрывающихся последовательностей из 50 наиболее распространенных

последовательностей оставшиеся уникальные и простые наборы перекрывающихся последовательностей были идентифицированы в базе данных miRNA (табл. 2).

CP-PVY siRNA были обнаружены в 50 наиболее распространенных последовательностях sRNA, в диапазоне от 2 до 7 уникальных последовательностей. Результаты секвенирования коротких РНК, полученных из хроматографических фракций PVY-инфицированных экспериментальных сортов Таврия и Изольда, представлены в табл. 3. Идентифицированные CP-PVY siRNA были комплементарны к различным участкам генома вируса как к положительной, так и к отрицательной цепям, в разных точках начала и конца трансляции. Таким образом, нам удалось выделить нуклеопротеиновый комплекс HC-Pro/siRNA из зараженных вирусом картофеля Y растений и идентифицировать специфичные к белку оболочки вируса PVY короткие интерферирующие РНК.

ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние коротких интерферирующих РНК на защитные противовирусные механизмы РНК-интерференции в данный момент активно изучается во всем мире. Наиболее эффективно антивирус-

ную защиту активируют siRNA специфичные к белку оболочки PVY [17]. Остаются не ясными многие аспекты молекулярного взаимодействия инструментов противовирусной защиты РНК-интерференции, важное значение в которой имеют короткие РНК. При попадании вирусной РНК в растительную клетку продуцируются dsRNA, которые посредством фермента DICER запускают внутриклеточный механизм, генерирующий короткие РНК. Короткие интерферирующие РНК активируют резистентность к вирусам путем программирования эффекторного комплекса RISC. Однако, в связи с постоянным появлением новых вредоносных рекомбинантных штаммов PVY вопрос изучения профилей sRNA для инициации устойчивости к вирусам приобретает особую актуальность. Более того, PVY использует клеточные механизмы для синтеза супрессорного белка HC-Pro, который блокирует защитную РНК-интерференцию путем захвата и удержания коротких РНК на поверхности субъединиц белка [11, 12, 18]. Мы обнаружили, что это свойство HC-Pro можно использовать для изоляции и очистки PVY-специфичных siRNA с целью последующего изучения их влияния на противовирусную защиту растений. Из PVY-инфицированных растений картофеля сортов Таврия и Изольда с помощью FPLC был фракционирован комплекс HC-Pro/siRNA (60 кДа) и осажден из фракций с использованием Protein G-agarose. Мол. вес выхода фракций, содержащих нуклеопротеиновый комплекс HC-Pro/siRNA, соответствует суммарному значению мол. м. HC-Pro, равной 50 кДа, и массе связанного с ним дуплекса 21–23 п.н. siRNA [11, 16]. После 3 независимых повторов FPLC, выделения и очистки комплекса HC-Pro/siRNA и изоляции sRNA комплекс HC-Pro/siRNA всегда обнаруживался во фракциях, соответствующих мол. м. 60 кДа. С помощью глубокого секвенирования коротких РНК в составе комплекса HC-Pro/siRNA были идентифицированы siRNA, специфичные к coat protein PVY, поскольку именно этот тип коротких интерферирующих РНК способен модулировать стабильную устойчивость к PVY у растений картофеля [17, 18]. Супрессорный белок HC-Pro с высокой специфичностью способен связывать множество фрагментов siRNA (примерно 30% из 50 наиболее распространенных sRNA). Профиль siRNA листовых экстрактов показал присутствие в комплексе HC-Pro/siRNA комплементарных различным участкам CP-PVY как из положительной, так и отрицательной цепей. Количество прочтений последовательности для CP-PVY siRNA в листовых пробах составляло от 3428 до 251 090, что свидетельствует о небольшом количестве CP-PVY siRNA, связанных HC-Pro, относительно всего пула коротких РНК в комплексе HC-Pro/sRNA. Это объясняется тем, что вовлечение в нуклеопротеиновый комплекс происходит на основании размера молекулы РНК

длиной 20–23 п.н. Тем не менее, идентифицированные CP-PVY siRNA потенциально смогут с высокой эффективностью активировать антивирусную резистентность к PVY у растений картофеля путем препятствования репликации вирусной РНК.

Методологический подход изоляции коротких РНК из тканей PVY-инфицированных растений *S. tuberosum* с помощью FPLC-фракционирования комплекса супрессорного протеина HC-Pro с молекулами коротких РНК с последующим секвенированием sRNA позволяет в значительной степени пополнить существующую базу данных нуклеотидных последовательностей коротких РНК, которые можно использовать в качестве объекта изучения регуляторных сигналов устойчивости к новым рекомбинантным штаммам PVY. Это исследование будет полезным для изучения и анализа PVY-специфичных siRNA, а также стимулировать новые исследования в области защиты растений от вирусных инфекций.

Исследования были проведены в рамках научного проекта “Разработка и внедрение инновационной технологии, направленной на придание антивирусной резистентности сортам сельскохозяйственных культур”, финансируемого Министерством науки и высшего образования Республики Казахстан, Индивидуальный регистрационный номер (ИРН): AP08052163.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Спонсоры не участвовали в разработке исследования; при сборе, анализе или интерпретации данных; в написании рукописи или в решении опубликовать результаты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Loebenstein G., Manadilova A.* Virus and virus-like diseases of major crops in developing countries // Springer, Dordrecht, Netherlands. 2003. P. 195. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0791-7_8
2. *Chikh-Ali M., Tran L.T., Price W.J., Karasev A.V.* Effects of the age-related resistance to potato virus Y in potato on the systemic spread of the virus, incidence of the potato tuber necrotic ringspot disease, tuber yield, and translocation rates into progeny tubers // *Plant Disease*. 2020. V. 104. P. 269. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1201-RE>
3. *Ghildiyal M., Zamore P.D.* Small silencing RNAs: an expanding universe // *Nat. Rev. Genet.* 2009. V. 10. P. 94. <https://doi.org/10.1038/nrg2504>
4. *Bushra T., Idrees A.N., Usman A., Tayyab H.* How RNA interference combat viruses in plants // *Functional Genomics*. 2012. V. 6. P. 113. <https://doi.org/10.5772/51870>
5. *Carthew R.W., Sontheimer E.J.* Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs // *Cell*. 2009. V. 136. P. 642. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>

6. *Dunoyer P., Himber C., Voinnet O.* DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal // *Nat. Genet.* 2005. V. 37. P. 1356. <https://doi.org/10.1038/ng1675>
7. *Omarov R., Sparks K., Smith L., Zindovic J., Scholthof H.B.* Biological relevance of a stable biochemical interaction between the tombusvirus-encoded P19 and short interfering RNAs // *J. Virol.* 2006. V. 80. P. 3000. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.6.3000-3008.2006>
8. *Li F., Ding S.* Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity // *Annu. Rev. Microbiol.* 2006. V. 60. P. 503. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142205>
9. *Sutula M.Y., Akbassova A.Z., Yergaliev T.M., Nurbekova Zh.A., Mukiyanova G.S., Omarov R.T.* Endowing plants with tolerance to virus infection by their preliminary treatment with short interfering RNAs // *Russ. J. Plant Physiol.* 2017. V. 64. P. 939. <https://doi.org/10.1134/S1021443717060103>
10. *Valli A.A., Gallo A., Rodamilans B., Lopez-Moya J.J., Garcia J.A.* The HCPro from the Potyviridae family: an enviable multitasking Helper Component that every virus would like to have // *Molecular plant pathology.* 2018. V. 19. P. 744. <https://doi.org/10.1111/mpp.12553>
11. *Shiboleth Y.M., Haronsky E., Leibman D., Arazi T., Wassenegger M., Whitham S.A., Gaba V., Gal-On A.* The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development // *J. Virol.* 2007. V. 81. P. 13135. <https://doi.org/10.1128/JVI.01031-07>
12. *Rawlings R.A., Krishnan V., Walter N.G.* Viral RNAi suppressor reversibly binds siRNA to outcompete Dicer and RISC via multiple turnover // *J. Mol. Biol.* 2011. V. 408. P. 262. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.02.038>
13. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol Plant.* 1962. V. 15. P. 473. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
14. *Coskun O.* Separation techniques: Chromatography // *North Clin Istanbul.* 2016. V. 3. P. 156. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>
15. *Toni L.S., Garcia A.M., Jeffrey D.A., Jiang X., Stauffer B.L., Miyamoto Sh.D., Sucharov C.C.* Optimization of phenol-chloroform RNA extraction // *MethodsX.* 2018. V. 5. P. 599. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.05.011>
16. *Plisson C., Drucker M., Blanc S., German-Retana S., Le Gall O., Thomas D., Bron P.* Structural characterisation of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 23753. <https://doi.org/10.1074/jbc>
17. *McCue K.F., Ponciano G., Rockhold D.R., Whitworth J.L., Gray S.M., Fofanov Yu., Belknap W.R.* Generation of PVY Coat Protein siRNAs in Transgenic Potatoes Resistant to PVY // *American J. Potato Res.* 2012. V. 89. <https://doi.org/10.1007/s12230-012-9257-0>
18. *Del Toro F.J., Donaire L., Aguilar E., Chung B.N., Tenllado F., Canto T.* Potato virus Y HCPro suppression of antiviral silencing in *Nicotiana benthamiana* plants correlates with its ability to bind *in vivo* to 21- and 22-nucleotide small RNAs of viral sequence. *J. Virol.* 2017. V. 91. <https://doi.org/10.1128/JVI.00367-17>