

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ» (ФГБНУ ВНИИСБ)

УДК 57.083

На правах рукописи

Архипов Андрей Владимирович

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ X ВИРУСА ШАЛОТА (РОД ALLEXIVIRUS)
С ФАКТОРАМИ АНТИВИРУСНОГО ИММУНИТЕТА
РАСТЕНИЯ-ХОЗЯИНА

Специальность: **1.5.6** – Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель

Кандидат биологических наук

Вишниченко Валерий Константинович

Москва 2024

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	7
ВВЕДЕНИЕ	8
Актуальность темы	8
Степень разработанности	10
Цель исследования	11
Задачи исследований	11
Научная новизна и практическая значимость работы	12
Методология и методы исследования	13
Основные положения диссертации, выносимые на защиту	14
Степень достоверности и апробация результатов	15
Объем и структура диссертации	18
Соответствие диссертации паспорту научной специальности	18
Личный вклад	18
I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	19
1. Род Allexivirus	19
1.1. Очерк исследований, результаты которых привели к выделению рода Allexivirus	19
1.2. Основные свойства аллексивирусов	21
1.2.1. Вирион	21

1.2.2. Капсидный белок и серологические свойства	21
1.2.3. Геном	22
1.2.4. Репликация	23
1.2.5. Спектр хозяев	23
1.2.6. Векторы	24
1.2.7. Заболевания и симптомы	24
1.3. Таксономия и классификация	25
1.4. Географическое распространение	27
2. X вирус шалота (ХВШ) - прототип рода <i>Allexivirus</i>	28
2.1. Открытие X вируса шалота	28
2.2. Морфология и серологические свойства вирионов ХВШ	29
2.3. Организация генома X вируса шалота	31
2.4. Белки, кодируемые геномом X вируса шалота	35
2.5. Синтез <i>in vitro</i> полноразмерной кДНК-копии геномной РНК ХВШ	39
2.6. Инфекционные РНК-транскрипты полноразмерной кДНК-копии геномной РНК ХВШ в клетках перевиваемой линии клеток сахарной свеклы	41
2.7. Участие ORFan белка р42 в формировании вирионов ХВШ	42
3. Эволюция аллексивирусов	44
3.1. Общие механизмы эволюции фитовирусов с РНК геномом	44
3.2. Концепция вирусного квазивида	50

3.3. Эволюционные взаимосвязи в пределах рода <i>Allexivirus</i>	55
4. РНК-интерференция как форма антивирусного фитоиммунитета	61
4.1. Молекулярные механизмы РНК – интерференции как пост– транскрипционного генного сайленсинга	61
4.2. Компоненты механизма посттранскрипционного сайленсинга генов	67
4.2.1. DICER-подобные белки	68
4.2.2. Малые интерферирующие РНК	73
4.2.3. Белки семейства AGO (Argonaute)	77
4.2.4. РНК-зависимая РНК полимераза (RdRP)	80
4.2.5. Эффекторный комплекс	83
5. Вирусные супрессоры РНК-интерференции	86
5.1. Идентификация вирусных супрессоров РНК-интерференции	86
5.2. Механизм действия вирусных супрессоров РНК-интерференции	88
5.3. Комплементационные взаимодействия между различными вирусными супрессорами РНК-интерференции	95
II МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	98
1. Получение растительного материала	98
2. Оценка уровня накопления X вируса шалот	98
3. Выделение тотальной РНК	99
4. Получение вирусного препарата ХВШ	99

5. Выделение вирусной РНК ХВШ	100
6. Синтез кДНК	100
7. Амплификация индивидуальных фрагментов кДНК	101
8. Амплификация 5'- и 3' - концевых фрагментов геномной РНК Х вируса шалота	101
9. Фракционирование ампликонов	102
10. ПЦР в реальном времени	103
11. Определение нуклеотидной последовательности	104
12. Компьютерный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей	104
13. Клонирование генов	105
14. Анализ полноразмерных кДНК копий генов, кодирующих белки Х вируса шалота	106
15. Инфильтрация векторов	106
16. Инокулирование интактных растений	106
17. Электрофорез в полиакриламидных гелях и иммуноблоттинг вирусных белков	107
III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	108
1. Анализ изменений в геноме Х-вируса шалота, персистирующего в вегетативно размножаемом шалоте	108
2. Исследование супрессорной активности белков кодируемых 3'- областью генома Х вируса шалота	116

3. Подавление экспрессии факторов РНК-сайленсинга при репродукции ХВШ	123
4. Транскрипционное репрограммирование в процессе персистентной инфекции ХВШ	138
5. Репродукция Х вируса шалота в чесноке	155
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	157
ВЫВОДЫ	161
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	163

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ХВШ - X вирус шалота.

RdRp - RNA-dependent RNA polymerase - РНК-зависимая РНК-полимераза.

ТБГ - Тройной блок генов.

КБ - Капсидный белок.

ЦББ - Цистеин богатый белок.

ОРС - Открытая рамка считывания.

AGO - белки ARGONAUTE.

DCL - Dicer-like proteins – Dicer-подобный белки.

GFP - green fluorescent protein - зеленый флуоресцентный белок.

ПЦР - полимеразная цепная реакция.

PTI - Pattern-triggered immunity - Паттерн-активированный иммунитет.

RQC - RNA Quality Control - Контроль качества РНК.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Растения постоянно подвергаются атакам со стороны разнообразных вирусных патогенов и реагируют на эти атаки, используя сложно устроенную иммунную систему. До недавнего времени в литературе наблюдалась тенденция рассматривать в качестве главного фактора антивирусного фитоиммунитета РНК-сайленсинг. В последнее время появляется все больше данных позволяющих считать, что в растительной клетке функционируют, по меньшей мере, два антивирусных иммунных механизма, "запускаемых" при участии двуцепочечных вирусных РНК – РНК-сайленсинг и РТІ. Процесс РТІ (pattern triggered immunity – паттерн-активированный иммунитет) инициируется в результате специфического узнавания двуцепочечных вирусных РНК, являющихся молекулярными паттернами, на настоящий момент неизвестными клеточными рецепторами, локализованными на плазмемной мембране растительной клетки. В свою очередь, РНК-сайленсинг представляет собой обусловленный гомологией нуклеотидных последовательностей эпигенетический механизм инактивации вирусных генов, индуктором каскада реакций которого являются репликативные (двуцепочечные) формы вирусных РНК, а ключевыми факторами дайсер-подобные белки (DCL), аргонавты (AGO) и РНК зависимая РНК-полимераза (RDR).

Исследование взаимодействия данных молекулярных процессов между собой и влияния вирусного патогена на это взаимодействие, представляется актуальным. Понимание молекулярных механизмов, обуславливающих состояние толерантности растений к вирусной инфекции, позволит выяснить, как эти процессы могут быть перепрограммированы с целью конструирования форм сельскохозяйственных растений, находящихся во взаимовыгодных симбиотических отношениях с инфицирующими их вирусами.

В качестве модели при решении поставленной задачи мы использовали персистентную инфекцию X вируса шалота (ХВШ), типового представителя нового рода аллексивирусов, в растениях вида *Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don являющимся новым и до настоящего исследования, считавшегося единственным восприимчивым хозяином ХВШ.

Вирус передается клещем *Aceria tulipae*. Вирион – нитевидный. Геном представляет собой одноцепочечную РНК (+) полярности, содержащую шесть открытых рамок считывания, кодирующих: вирусную репликазу, белки, гомологичные транспортным белкам ТБГ1 и ТБГ2 многих нитевидных и палочковидных вирусов растений, уникальный белок р42, капсидный и цистеин-богатый белки.

Существенную роль в видообразовании, то есть приданию вирусному организму его уникальных свойств играют таксонспецифичные (ORFan) белки, возникающие в результате длительного процесса эволюции путем одиночных замен, сдвига рамки считывания, либо интенсивных мутаций, в ответ на требование приспособиться к изменениям условий среды.

Для X вируса шалота таким является таксонспецифичный белок р42. Нуклеотидная последовательность, кодирующая р42, не имеет гомологов за пределами рода и является молекулярной сигнатурой аллексивирусов.

Помимо России, ХВШ в настоящее время обнаружен в Германии, Голландии, Индии, Новой Зеландии, Судане и в настоящем исследовании в Эквадоре.

Репродукция исследуемого в настоящей работе российского штамма ХВШ поддерживалась в вегетативно размножаемых растениях шалота в течение 20 лет.

Представляется актуальным изучение изменений, которые могли произойти в вирусном геноме в процессе длительной адаптации к условиям размножения в новом хозяине, позволяющих вирусу успешно противостоять врожденному иммунитету растений.

Хотя общепринятым является представление о том, что в условиях функционирования РНК-сайленсинга ключевую роль в обеспечении успешной репродукции фитовирусов играют вирусные белки-супрессоры, в ходе настоящего исследования установлено отсутствие супрессорной активности белков, кодируемых геном ХВШ. Следовательно, вирус преодолевает иммунный барьер сайленсинга с помощью каких-то иных механизмов. В качестве основной гипотезы мы предположили, что таким механизмом может быть индукция вирусом РТІ и, как следствие, специфическое транскрипционное репрограммирование, приводящие к подавлению экспрессии ключевых факторов фитоиммунитета.

Степень разработанности

В 1971г., показана возможность передачи клещом *Aceria tulipae* некоего не идентифицированного растительного вируса репродуцирующегося в *Allium cepa* (Razvjazkina, 1971).

В 1991, гибкие палочковидные вирионы, принадлежащие вирусу передающимся клещом *Aceria tulipae*, классифицированы как принадлежащие роду *Rymovirus* семейства *Potyviridae* (Van Dijk, 1991). Как показали результаты дальнейших исследований – ошибочно.

В 1993, в лаборатории молекулярной вирусологии ВНИИСБ, открыт гибкий, палочковидный, передающейся клещом вирус, обладающий характерным, присущим только ему, строением генома. Вирус назван Х вирусом шалота. (Vishnichenko, et.al., 1993, Kanyuka, et.al., 1992).

В 1993-2000 гг, различными группами исследователей сообщалось о вирусах, обладающих сходной с ХВШ организацией генома. (Sumi et. al., 1993, Barg et. al., 1994, Helguera et. al., 1996, Yamashita et. al., 1996, Song et. al., 1998, Sumi et. al., 1999).

В 2000 г., сотрудниками лаборатории молекулярной биотехнологии ВНИИСБ, предложено выделить новый род растительных вирусов - *Allexivirus* (*Allium X virus*), прототипом которого является X вирус шалота. (Zavriev, Vishnichenko, 2000).

Лук шалот, *Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don., до настоящего исследования, считался единственным восприимчивым хозяином ХВШ.

До настоящего исследования полностью отсутствовала информация о экспрессии молекулярных факторов иммунитета Шалота, как генов, задействованных в процессе РНК-сайленсинга так и генов, задействованных в РТИ.

Цель исследования

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния инфекции X вируса шалота на механизмы иммунной системой растения хозяина.

Задачи исследований

В связи с тем, что информация об особенностях молекулярной биологии X вируса шалота крайне ограничена, предполагалось решение следующих задач:

1. Провести анализ и выявить возможные адаптационные изменения, произошедшие в вирусном геноме в процессе длительной репродукции в вегетативно размножаемых растениях шалота.

2. Идентифицировать обладающие супрессорной активностью белки X вируса шалота, позволяющие эффективно ингибировать локальный и системный сайленсинг генов - один из механизмов антивирусного иммунитета.

3. Идентифицировать в геноме *Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don., нуклеотидные последовательности, кодирующие ключевые факторы антивирусного иммунитета.

4. Сравнить относительный уровень экспрессии генов, участвующих в антивирусном фитоиммунитете, в безвирусном и инфицированном ХВШ шалоте.

5. Экспериментально проверить гипотезу, согласно которой ХВШ оказывается способным репродуцироваться в растениях шалота благодаря его способности индуцировать РТИ и транскрипционное репрограммирование, в результате чего вирус подавляет различные факторы антивирусного иммунитета.

6. Проверить гипотезу о *Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don., как единственном растении-хозяине Х вируса шалота.

Научная новизна и практическая значимость работы

В данной работе установлен факт репродукции Х вируса шалота в отсутствии собственного белка супрессора РНК – сайленсинга.

Подтверждена гипотеза, объясняющая факт репродукции ХВШ, в отсутствии собственного белка супрессора, способностью вируса полностью или частично изменять экспрессию белков, задействованных в обеспечении антивирусного фитоиммунитета. Подавление экспрессии ключевых факторов РНК-сайленсинга в инфицированных растениях и, контролируемое во времени, избирательное изменение уровней экспрессии ряда генов-мишеней, кодирующих другие факторы антивирусного фитоиммунитета, обусловлено индукцией вирусом процесса РТИ.

В настоящей работе установлен факт репродукции ХВШ в посадках чеснока (*Allium sativum*). До проведения актуального исследования предполагалось, что единственным хозяином ХВШ является шалот (*Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don.).

Методология и методы исследования

В работу вошли данные, полученные с использованием молекулярно-биологических и биотехнологических методов лабораторного анализа: метод обратной транскрипции, ПЦР по конечной точке, ПЦР в реальном времени, секвенирование по Сэнгеру, способ создания векторных конструкции на основе плазмиды PLN 7000 методом рестрикции и лигирования, Вестерн-блоттинг.

Работа выполнена в лаборатории молекулярной вирусологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), г.Москва.

Автор выражает благодарность коллегам Центра инженерных исследований и разработок, Кито, Эквадор [Universidad Tecnológica Equinoccial (UTE), Facultad de Ciencias de la Ingeniería e Industrias, Quito, Ecuador; G. Landázuri, Centro de Investigación, Estudios y Desarrollo de Ingeniería (CIEDI), Quito, Ecuador], за любезно предоставленную возможность исследовать репродукцию X вируса шалота в чесноке на посадках Алаузи, провинция Чимборасо, Эквадор.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

- Функциональные модули РНК-генома ХВШ, демонстрируют различную скорость эволюционных изменений, имеющих явный адаптационный характер, приобретенный в результате репродукции в новом хозяине.
- Репродукция Х вируса шалота проходит, в отсутствие собственного белка супрессора. Установлено отсутствие супрессорной активности РНК-сайленсинга у белков, кодируемых геномом Х вируса шалота.
- Впервые идентифицированы последовательности кодирующие фрагменты генов обуславливающие антивирусный фитоиммунитет (факторы РНК-сайленсинга, РТІ, аутофагии и RNA Quality Control) *Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don. Представлен анализ уровней экспрессии данных последовательностей.
- Подтверждена гипотеза, объясняющая факт репродукции Х вируса шалота, в отсутствие собственного белка супрессора, способностью вируса полностью или частично изменять экспрессию белков, задействованных в обеспечении антивирусного фитоиммунитета. Подавление экспрессии ключевых факторов РНК-сайленсинга в инфицированных растениях и, контролируемое во времени, избирательное изменение уровней экспрессии ряда генов-мишеней, кодирующих другие факторы антивирусного фитоиммунитета, обусловлено индукцией вирусом процесса РТІ.
- Показана возможность репродукции ХВШ в *Allium sativum* L.

Степень достоверности и апробация результатов

Основные результаты исследований доложены на всероссийских и международных научно-практических конференциях: Международная научно-практическая конференция «Иммунитет растений к инфекционным заболеваниям», посвященная 100-летию монографии Н.И. Вавилова (Москва, 2019); VIII научно-практическая конференция с международным участием. «Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции» (Ростов-на-Дону, 2019); XVII молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2017); XIII молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2013); IX молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2009).

Достоверность полученных результатов основывается на использовании достаточного объема экспериментального материала, соответствующих для поставленных задач методов исследования и методов обработки данных.

По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 1 статья в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных, 5 работ в сборниках научных конференций.

Статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:

* Архипов А. В. Индукция PTI (Pattern-Triggered Immunity) и транскрипционное репрограммирование при персистентной аллелсывирусной инфекции / А.В. Архипов, В.К. Вишниченко // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53. – № 5. – С. 947-957.

* Архипов А. В. Персистентная инфекция X-вируса шалота сопряжена с подавлением транскрипции генов клеточной РНК-зависимой РНК-

полимеразы и dcl-белков в корнях инфицированных растений / А.В. Архипов, А.Г. Соловьев, В.К. Вишниченко // Молекулярная биология. – 2017. – Т. 51. – № 1. – С. 126–130.

* Архипов А. В. Накопление изменений в геноме X вируса Шалота персистирующего в вегетативно размножаемых растениях / А.В. Архипов, В.А. Гущин, В.К. Вишниченко, А.Г. Соловьев // Доклады Академии Наук. – 2013. – Т. 452. – № 2. – С. 1–4.

* Архипов А. В. Репродукция X вируса шалота в отсутствии собственного активного белка-супрессора РНК сайленсинга / А.В. Архипов, А.Г. Соловьев, В.К. Вишниченко // Доклады РАСХН. – 2013 – Т. 2. – С. 14–17.

* Архипов А. В. Обнаружение нуклеотидных последовательностей, кодирующих DCL-белки в растениях шалота *Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don / А.В. Архипов, В.К. Вишниченко // Сельскохозяйственная биология. – 2011. - № 5 – С. 51–55.

Статьи в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных:

* Granda R. First report of Shallot virus X (ShVX) in garlic in Ecuador / R. Granda, G. Landázuri, **A.V. Arkhipov** // Plant Disease. – 2017. – V. 101. – № 6. – P.1066.

Статьи в сборниках конференций:

*Архипов А. В. Молекулярные механизмы толерантности растений к вирусным патогенам: изменения транскрипционных программ экспрессии факторов аутофагии и RQC (RNA quality control) в процессе персистентной аллексивиральной инфекции. / А.В. Архипов, В.К.Вишниченко / Международная научно-практическая конференция «Иммунитет растений к

инфекционным заболеваниям», посвященной 100-летию монографии Н.И. Вавилова, Москва //Аграрная наука. – 2019. – Т. 2. – № 5. – С. 50-56.

*Архипов А. В. Изменения транскрипционных программ экспрессии факторов врождённой иммунной системы растения-хозяина в условиях персистентной вирусной инфекции. / А.В. Архипов, В.К.Вишниченко // Материалы VIII научно-практической конференции с международным участием. Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции. – Ростов-на-дону. – 2019. – С. 64-65.

* Архипов А. В. Индукция pti (pattern-triggered immunity) и транскрипционное репрограммирование в процессе персистентной аллеловирусной инфекции. // Сборник XVII молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева. – Москва. – 2017. – С. 19-22.

* Архипов А. В. Эволюция генома X вируса шалота (род Alexivirus), персистирующего в вегетативно размножаемых растениях *Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don. в условиях моноинфекции. // Сборник XIII молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева. – Москва. – 2013. – С. 7-8.

* Архипов А. В. Исследование супрессорной активности 42К белка X вируса шалота. // Сборник IX молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева. – Москва. – 2009.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа написана изложена на 187 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, глав с описанием использованных материалов и методов, глав с описанием полученных результатов, заключения и списка цитируемой литературы, включающего 238 отечественных и зарубежных источников. Полученные данные сведены в 16 таблиц и проиллюстрированы 23 рисунками.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Основные научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 1.5.6 – Биотехнология, а именно областям исследований: генетические, селекционные и иммунологические исследования в прикладной микробиологии, вирусологии и цитологии; иммунная биотехнология и др.

Личный вклад

Все технические действия согласно методам, представленным в настоящей работе, выполнялись непосредственно автором.

Анализ полученных данных, описание и обсуждение результатов, оформление диссертации и автореферата выполнены автором самостоятельно.

Автор принимал непосредственное участие в подготовке к публикации в научных изданиях статей и тезисов по материалам диссертационной работы.

I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Род *Allexivirus*

1.1. Очерк исследований, результаты которых привели к выделению рода *Allexivirus*

В 1971г. Развязкина (Razvjazkina, 1971) показала возможность передачи клещом *Aceria tulipae* некоего не идентифицированного растительного вируса репродуцирующегося в луке (*Allium cepa*).

В 1991 Ван Дейк (Van Dijk, 1991), фактически повторив опыт Развязкиной на большом количестве материала, исследовав образцы лука, чеснока, лука причесночного (*Allium scorodoprasum*) и шалота из ряда стран, в том числе России, Японии, Китая, Ирана и др, среди популяции вирусов присутствующей в данных растениях обнаруживает гибкие палочковидные вирионы принадлежащие вирусу также передающимся клещом *Aceria tulipae*. Вирус не передавался тлями и не реагировал с антисыворотками против переносимых тлями потивирусов. Вирус так же не вызвал видимых признаков на зараженных растениях, кроме умеренных признаков штриховатости на шалоте сорта 'Sante'.

Изоляты этого вируса названы Ван Дейком латентным вирусом лука переносимым клещом (Onion mite-borne latent Virus OMbLV) и чесночным штаммом данного изолята, поражающим чеснок (OMbLV-G) и переносимым клещом латентным вирусом шалота (Shallot mite-borne latent virus, SMbLV). (Mansouri, Rysanek, 2021)

И хотя данные изоляты не реагировали с антисыворотками против потивирусов, основываясь на способе передачи, форме длине вирусных частиц (приблизительно 700 - 800 нм), и присутствие гранулированных включений в зараженной ткани Ван Дейк классифицировал исследуемый вирус как принадлежащий роду *Rymovirus* семейства *Potyviridae* (Van Dijk, 1991). Как показали результаты дальнейших исследований – ошибочно.

Ключевым моментом является открытие в лаборатории молекулярной вирусологии ВНИИСБ, с использованием методов иммуноферментного анализа, иммуноэлектронной микроскопии, иммуноблоттинга и секвенирования, гибкого, палочковидного, передающегося клещом вируса, обладающего характерным, присущим только ему, строением генома. Вирус назван X вирусом шалота. (Vishnichenko, et.al., 1993, Kanyuka, et.al., 1992).

В 1993 Суми (Sumi et. al., 1993) с сотрудниками, используя методы Нозерн-блот гибридизации и секвенирования при анализе вирусной популяции, выделенной из чеснока (*Allium sativum*), идентифицировал, обладающие сходной с ХВШ организацией генома, вирусы, названные GV-A, GV-B, GV-C и GV-D.

Баргом идентифицированы (Barg et. al., 1994) с использованием серологического исследования, родственные ХВШ, по крайней мере, пять различных типов так называемого нитевидного вируса, переносимого клещом (MBFV).

В Аргентине обнаружен нитевидный переносимый клещом вирус чеснока – GarMbFV. (Helguera et. al., 1996).

В Японии установлена последовательность другого переносимого клещом вируса, вызывающего мозаику у чеснока и обладающего сходным с ХВШ строением генома. Вирус получил название – GMbMV – переносимый клещом вирус мозаики чеснока (Yamashita et. al., 1996).

Методом секвенирования по Сэнгеру установлены нуклеотидные последовательности X вируса чеснока (Song et. al., 1998); E-вируса чеснока (Chen and Adams, 2001); D- вируса чеснока. Определение неполной последовательности D- вируса чеснока осуществлено Суми (Sumi et. al., 1993), нуклеотидный состав полноразмерной последовательности определен Вули (Wylie et. al., 2013). Представлена информация о полноразмерной последовательности геномной РНК вирусов чеснока А - и С (Sumi et. al., 1999).

На основании анализа вышеизложенной информации и принимая во внимание способ передачи, форму вириона, серологические свойства, характерные особенности строения генома сотрудниками лаборатории молекулярной биотехнологии ВНИИСБ (Zavriev, Vishnichenko, 2000), предложили выделить новый род растительных вирусов - *Allexivirus* (*Allium X virus*), прототипом которого является X вирус шалота.

1.2. Основные свойства аллексивирусов

1.2.1. Вирион

X вирус шалота (XBIII) – гибкий нитевидный вирус, открытый в России в начале 90-х годов прошлого века и ставший прототипом нового рода *Allexivirus*.

Вирион аллексивирусов – гибкие палочковидные частицы с модальной длиной около 800 нм и диаметром 12 нм. Капсид обладает спиральной симметрией. Суперкапсидная оболочка отсутствует. (Vishnichenko et. al., 1993).

1.2.2. Капсидный белок и серологические свойства

Молекулярная масса белков оболочки (БО) аллексивирусов составляет 26-28 кДа. Капсид X вируса шалота формируют 2500 идентичных капсомеров (Vishnichenko et. al., 1993). Вирион XBIII серологически не родственен обладающим сходной формой капсида, вирионам потививирусов (Van Dijk et. al., 1991)

1.2.3. Геном

Геном представлен одноцепочечной РНК (+) полярности, длиной около 9000 нуклеотидов. В геномной последовательности присутствуют шесть открытых рамок считывания (ОРС).

Сразу за 5' –не транслируемой областью, следует ОРС1 кодирующая вирусную репликазу.

Белки, кодируемые ОРС2 и ОРС3, гомологичны транспортным белкам ТБГ1 и ТБГ2 многих нитевидных и палочковидных вирусов растений.

Последовательность между ОРС 3 и 4 гомологична последовательностям в составе тройного блока генов у потексвирусов и карлавирусов у которых данная последовательность кодирует 7-8к белок, однако у ХВШ данная последовательность не имеет иницирующего кодона AUG.

Последовательность открытой рамки считывания 4 не встречается за пределами рода, являясь молекулярной сигнатурой алексивирусов.

На 3'-конце геномной РНК расположен полиА-трек, длиной до 200 нуклеотидов. Вирион ХВШ может также содержать двуцепочечную РНК (дцРНК), размером около 1500 пар нуклеотидов. (Vishnichenko et. al., 1993; Kanyuka et. al., 1992)

1.2.4. Репликация

В литературе не представлена информация, касающаяся цикла репродукции алексивирусов. Однако исходя из строения генома логично предположить, что цикл репродукции алексивирусов включает использование аналогичного механизма репликации характерного для иных вирусов с однопонтевым позитивным геномом. После попадания в клетку и высвобождения нуклеиновой кислоты, (+) РНК-геном выступая в качестве матричной РНК синтезирует на рибосомах вирусоспецифические белки, закодированные в геноме. «После того, как синтезирована вирусоспецифическая РНК-зависимая РНК-полимераза и другие неструктурные белки, начинается репликация РНК. В конце цикла вновь синтезированные структурные белки вириона и РНК собираются с образованием вирусного потомства» (Сизенцов, 2012).

1.2.5. Спектр хозяев

Алексивирусы заражают чеснок, лук-порей, лук, и различные дикие виды луковых. Считалось, что чеснок и *S. murale*, может выступать хозяином для большинства алексивирусов, кроме ХВШ (Perotto et. al., 2003; Yamashita et. al., 1996). В России продуктивная репродукция Х вируса шалота, наблюдалась только в растениях лука-шалота (Vishnichenko et. al., 1996). Хотя спектр хозяев алексивирусов ограничен, и включает, главным образом, род *Allium*, в последнее время получены сообщения о заражении двудольных растений вирусами, геномы которых имеют явную гомологию с алексивирусами однодольных (Machado, 2006; Sabanadzovic, 2011; Dutta, 2013).

1.2.6. Векторы

Единственный переносчик алексивирусов - клещ *Aceria tulipae*. Перенос ХВШ происходит как при вегетации шалота, так и при хранении луковиц (Katis et. al., 2012; Vishnichenko et. al., 1993). Литературные данные, связанные с особенностями передачи, ограничены. Вероятно, определенные способы хранения луковиц могут приводить к увеличению популяции клещей, и затем к сопутствующему распространению вирусов (Barg et. al., 1997).

1.2.7. Заболевания и симптомы

Инфекция X вируса шалота протекает в латентной форме (Katis et al., 2012; Vishnichenko et. al., 1993).

Очень редко на зараженных алексивирусами растениях присутствует слабые хлоротичные штрихи или слабовыраженная мозаика (Yamashita et. al., 1996). Природа данных симптомов до конца не ясна, возможно, эффект может быть вызван действием клеща *Aceria tulipae* (Barg et. al., 1997).

1.3. Таксономия и классификация

На данный момент таксономическая структура X вируса шалота, следующая: порядок *Tymovirales*, семейство *Alphaflexiviridae*, род *Allexivirus*, подрод *Acarallexivirus*, вид *Shallot virus X*.

На данный момент порядок *Tymovirales* насчитывает 5 семейств и 28 родов (Таблица 1).

Первоначально рода вирусов, входящие на данный момент в пять отдельных семейства *Alpha- Beta- Delta- Gammaflexiviridae* и *Tymoviridae* составляли единой семейство *Flexiviridae* в которое сразу после открытия были отнесены алексивирусы, в том числе, и ХВШ (Zavriev, Vishnichenko, 2000).

Принципиальной основой для выделения семейства *Flexiviridae* явилось то обстоятельство, что флексивирусы обладают характерным, отличным от морфологически сходных с ними потивирусов и кластеровирусов, планом строения генома и что репликативные и структурные белки флексивирусов имеют очевидное филогенетическое родство. (Калошин, 1999).

В последствии, род алексивирусов был таксономически отнесен к семейству *Alphaflexiviridae* на основании результатов сравнения нуклеотидных последовательностей репликаз алексивирусов и вирусов иных родов в порядке *Tymovirales* (Adams et. al., 2011).

Таблица 1. Таксономия порядка Tymovirales. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV, Virus Taxonomy: 2022 Release).

Порядок:	Tymovirales					
Семейство:	Alphaflexiviridae	Betaflexiviridae		Deltaflexiviridae	Gammaflexiviridae	Tymoviridae
Подсемейство:		Quinvirinae	Trivirinae			
Род:	Alexivirus Botrexvirus Lolavirus Platypuvirus Potexvirus Sclerodarnavirus	Banmivirus Carlavirus Foveavirus Robigovirus Sustrivirus	Capillovirus Chordovirus Citrivirus Divavirus Prunevirus Ravavirus Tepovirus Trichovirus Vitivirus Wamavirus	Deltaflexivirus	Gammaflexivirus Mycoflexivirus Xylavirus	Maculavirus Marafivirus Tymovirus
Вид:		Banana virus X				Bombyx mori latent virus Poinsettia mosaic virus

Входящий в семейство *Alphaflexiviridae* род *Alexivirus* в настоящее время, по данным международного комитета таксономии вирусов, включает виды Shallot virus X и A- B - C - D - E - X -Garlic virus формирующие подрод *Acarallexivirus*, а также виды Garlic mite-borne filamentous virus; Alfalfa virus S; Arachis pintoï virus; Blackberry virus E; Senna severe yellow mosaic virus; Vanilla latent virus. (ICTV, Virus Taxonomy: 2022 Release).

Так же два сравнительно недавно открытых вида вирусов, предположительно могут являться алексивирусами, наравне с E вирусом ежевики (BVE, Blackberry virus E), а именно вирус мозаики белого ясеня (WAMV, White ash mosaic virus) и вирус эскобарии (isolate 05TGP00120D Escobaria virus).

Основанием позволяющим считать данные вирусы родственными алексивирусам является явная гомология в строении геномов данных вирусов и алексивирусов.

В геномах Е вируса ежевики, вируса мозаики белого ясеня и вируса эскобарии присутствует последовательность открытой рамки считывания 4 кодирующая белок р42.

В геномах данных вирусов, исключая вирус эскобарии, как и у алексивирусов отсутствует иницирующий кодон AUG в ОРС, кодирующей белок ТБГЗ тройного блока генов. Характерной особенностью строения генома этих вирусов, отличающих их от алексивирусов является отсутствие открытой рамки считывания 6 кодирующей цистеин богатый белок (Machado, 2006; Sabanadzovic, 2011; Dutta, 2013).

1.4. Географическое распространение

Алексивирусы обнаружены во Франции, Испании (Van Dijk, 1993), Израиле, Словении (Mavric и Ravnikar, 2005), Германии, Голландии, Индии и Новой Зеландии, и других странах (Hamed et. al., 2012).

2. X вирус шалота (ХВШ) - прототип рода *Allexivirus*.

2.1. Открытие X вируса шалота

«X вирус шалота открыт в России, в 1991 г., при исследовании растений шалота селекционного образца N803 инокулированных экстрактом шалота сорта Тагар полученного из монголии в качестве источника вируса желтой карликовости лука, ВЖКЛ, род *Potyvirus*» (Kanyuka et.al., 1992).

«В образцах шалота обнаружено накопление в значительных количествах вирионов, при исследовании которых методом иммуноблоттинга и иммуноэлектронной микроскопии было показано, что гибкие вирусные частицы, накапливающиеся в растениях шалота N803, являются вирионами какого-то иного вируса. Тот факт, что в инфицированных растениях шалота не обнаруживаются характерные для потивирусов, цитоплазматические включения (pinwheels) позволял сделать предварительный вывод о том, что этот новый вирус, названный X вирусом шалота, не принадлежит к роду *Potyvirus*» (Kanyuka et.al., 1992).

«Окончательный вывод о видовой принадлежности вируса позволило сделать определение в 1992г., полной нуклеотидной последовательности геномной РНК ХВШ» (Kanyuka et.al., 1992).

Новый вирус - прототип будущего рода *Allexivirus* - стал вторым после вируса табачной мозаики (Ивановский, 1892) фитовирусом, впервые обнаруженным в России.

2.2. Морфология и серологические свойства вирионов ХВШ

«Большую часть популяции частиц ХВШ представлена гибкими частицами с модальной длиной 800 нм, диаметром 12 нм (ХВШ-I) и с характерной поперечной исчерченностью. В качестве минорного компонента присутствуют вирионы диаметром 6 нм (ХВШ-II) и, вероятно, большей длиной» (Калошин, 1999; Vishnichenko et. al., 1993).

В отдельных растениях, использовавшихся для выделения высокоочищенных препаратов ХВШ-II, 95% популяции вирусных частиц составлял данный тип вирионов (рис 1).

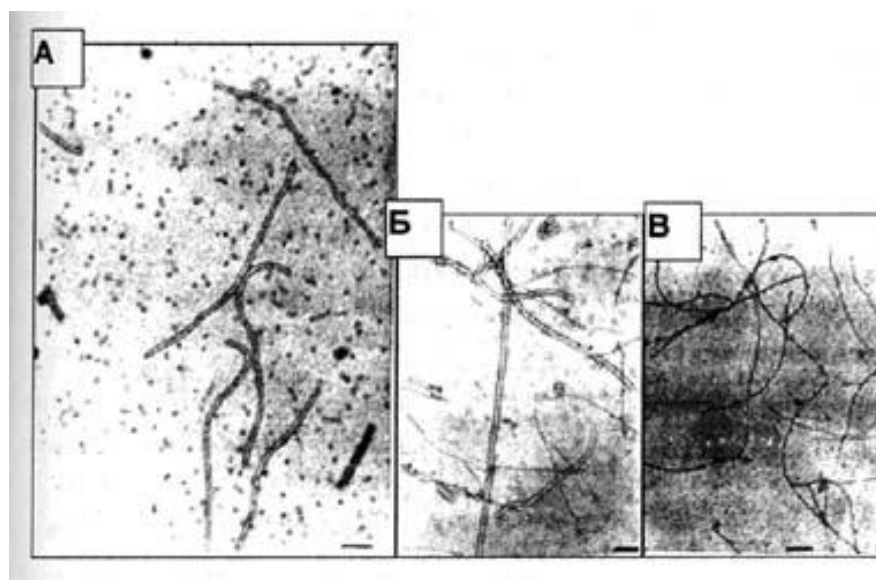


Рисунок 1. «Электронные микрофотографии вирусных частиц, присутствующих в препаратах ХВШ, полученные из индивидуальных растений шалота: А – вирионы первого класса. Б - вирионы первого и второго классов. В - вирионы второго класса. Масштабные линии соответствуют 50 нм» (Калошин, 1999; Vishnichenko et. al., 1993).

«Вирионные РНК, выделенные из препаратов частиц первого и второго классов, обладают одинаковой электрофоретической подвижностью в неденатурирующих агарозных гелях. Результаты блот-гибридизационного анализа позволяют сделать вывод о высокой степени гомологии геномных РНК двух исследуемых классов частиц: при использовании радиоактивного зонда, комплементарного 3'-концевому участку РНК ХВШ, и в условиях равных концентраций препараты РНК, выделенные из частиц первого и второго классов, характеризовались близкими уровнями интенсивности гибридизационных сигналов» (Калошин, 1999).

«Для детекции ХВШ использовались две вирусспецифичные антисыворотки: против рекомбинантного белка оболочки (БО ХВШ-Ас) и против вирусных частиц (ХВШ-Ас)» (Калошин, 1999; Аршава и др., 1996).

«В препаратах вирионов обоих классов в качестве основного компонента присутствуют белки с молекулярными массами 37кДа которые в экспериментах по иммуноблотингу интенсивно взаимодействуют как с антисывороткой против рекомбинантного белка оболочки ХВШ, так и с антисывороткой против препаратов частиц второго класса». (Калошин, 1999).

«О близком серологическом родстве белков оболочки вирионов первого и второго классов свидетельствуют также результаты экспериментов по иммуноэлектронной микроскопии частично очищенных препаратов ХВШ». (Калошин, 1999).

«Как следует из этих данных, антисыворотка против рекомбинантного белка оболочки ХВШ интенсивно декорировала оба класса частиц. Аналогичные результаты были получены также при использовании в экспериментах по декорированию антисывороток, полученных против очищенных частиц первого или второго классов» (Калошин, 1999).

«Таким образом в вирусных препаратах ХВШ, обнаруживаются вирионы двух морфологических классов. Эти частицы с различной морфологией образуются при участии гомологичных геномных РНК, при этом степень гомологии нуклеотидных последовательностей 3'-концевых областей геномных РНК вирионов первого и второго классов составляет 87%, у генов 42К белка она равна 81%, белка оболочки - 98% и генов 15К белка - 95%. Данная информация, как и факт серологической идентичности белков оболочки, дает основание рассматривать частицы обоих классов как различные формы вирионов ХВШ» (Калошин, 1999).

2.3. Организация генома X вируса шалота

Полная нуклеотидная последовательность геномной РНК ХВШ была определена в лаборатории молекулярной вирусологии ВНИИСБ. (Kanyuka et. al., 1992).

Геномная РНК X вируса шалота содержит 8890 нуклеотидов, исключая 3' поли-А последовательность. При этом состав нуклеотидов распределяется следующим образом: 28,6% А, 22,2% U, 20,6% G и 28.6 % С.

В геноме ХВШ (Рис. 2) присутствуют шесть открытых рамок считывания (ОРС), два нетранслируемых 5'- и 3'- концевых региона и три внутренних нетранслируемых последовательности в межгеномном пространстве.

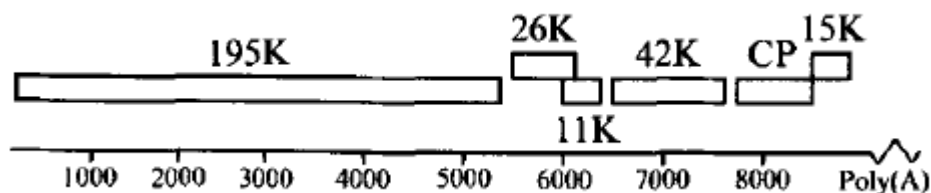


Рис 2. Схематическое изображение строения генома ХВШ, включающая все генетические элементы (Kanyuka et. al., 1992).

ОРС 1, открытая рамка считывания, насчитывающая 5157 нуклеотидов и располагающаяся в 5'-концевой области геномной РНК, (позиции 99-5255), кодирует наиболее протяженный белок, с расчетной массой 195 кДа.

Следом за ОРС 1 располагаются открытые рамки считывания 2 и 3 кодирующие белки, с молекулярными массами 25 кДа и 11 кДа. Последовательности ОРС 2 и 3 частично перекрываются друг с другом. При этом терминирующий кодон открытой рамки считывания 2 располагается в пределах ОРС 3 соответствуя двадцать третьему нуклеотиду от ее иницирующего кодона.

«Эти ОРС формируют так называемый тройной блок генов (ТБГ) - консервативный генный модуль, присутствующий в геномах многих нитевидных и палочковидных вирусов растений и кодирующий вирусные транспортные белки ТБГ 1, ТБГ 2 и ТБГ 3 (Beck et. al., 1991). Однако в геномах всех известных вирусов рода *Allexivirus* отсутствует ОРС для белка ТБГ3, третьего белка, кодируемого участком тройного блока генов. Сама последовательность, длиною 113 нуклеотидов, кодирующая ТБГ3, но не имеющая инициаторного кодона AUG, присутствует в районе генома характерном для данного гена у родственных вирусов» (Архипов, 2013; Kanyuka et. al., 1992; Adams et. al., 2011).

Между последовательностями тройного блока генов и ОРС, кодирующей белок оболочки у всех известных алексивирусов, находится открытая рамка считывания 4, кодирующая уникальный серин-богатый белок с расчетной молекулярной массой 42кДа (32-42 кДа у иных алексивирусов). Наличие этой ОРС является наиболее характерной чертой рода *Allexivirus* (Kanyuka et. al., 1992; Sumi et. al., 1993; Yamashita, 1996; Рябов и др., 1996; Song et. al., 1998).

Последовательность ОРС 5 кодирующая, являющийся белком оболочки, пептид расчетной молекулярной массой 28 кДа перекрывается с открытой рамкой считывания 6 ровно на один нуклеотид являющийся последним в терминирующем триплете ОРС 5 и, одновременно, первым в иницирующем триплете ОРС 6. (Kanyuka et. al., 1992, Shallot virus X NCBI GenBank: NC_003795.1).

Последняя открытая рамка считывания 6, кодирует небольшой цистеин-богатый белок (ЦББ), массой 15 кДа, имеющий сходство аминокислотной последовательности с 12К белками карлавирусов.

Первый, в направлении 5'- 3'-, нетранслируемый регион длиной 62 нуклеотида разделяет открытые рамки считывания 1 и 2. Еще один нетранслируемый фрагмент, размером 26 нуклеотидов располагается в 3' части генома, между ОРС 4 и 5.

5' не транслируемая область включает 98 нуклеотидов и аналогична 5' не транслируемой области РНК X вируса картофеля (Huisman et. al., 1988).

3' не транслируемая область состоит из 112 нуклеотидов, после которой располагается поли-(А) трек (Kanyuka et. al., 1992).

Первичная структура РНК ХВШ сходна с организацией генома у потекс- и карлавирусов (рис.2). 5'- геномная область ХВШ сходна по строению с 5'- областью генома потексвирусов, при этом только в двух из многих потексвирусных геномах, установленных к настоящему времени, а именно, в Lily virus X и Strawberry mild yellow edge-associated virus, ген TGB3 не имеет иницирующего кодона (Memelink et. al., 1990; Jelkmann et. al., 1990). 3'- геномная область ХВШ, напротив, сходна по строению с 3' областью карлавирусов (Kanyuka et. al., 1992).

Генетические элементы, за исключением последовательности транслирующей белок р42К, формирующие геном ХВШ характерны и для вирусов некоторых иных семейств (рис 3.), со сходной структурой.

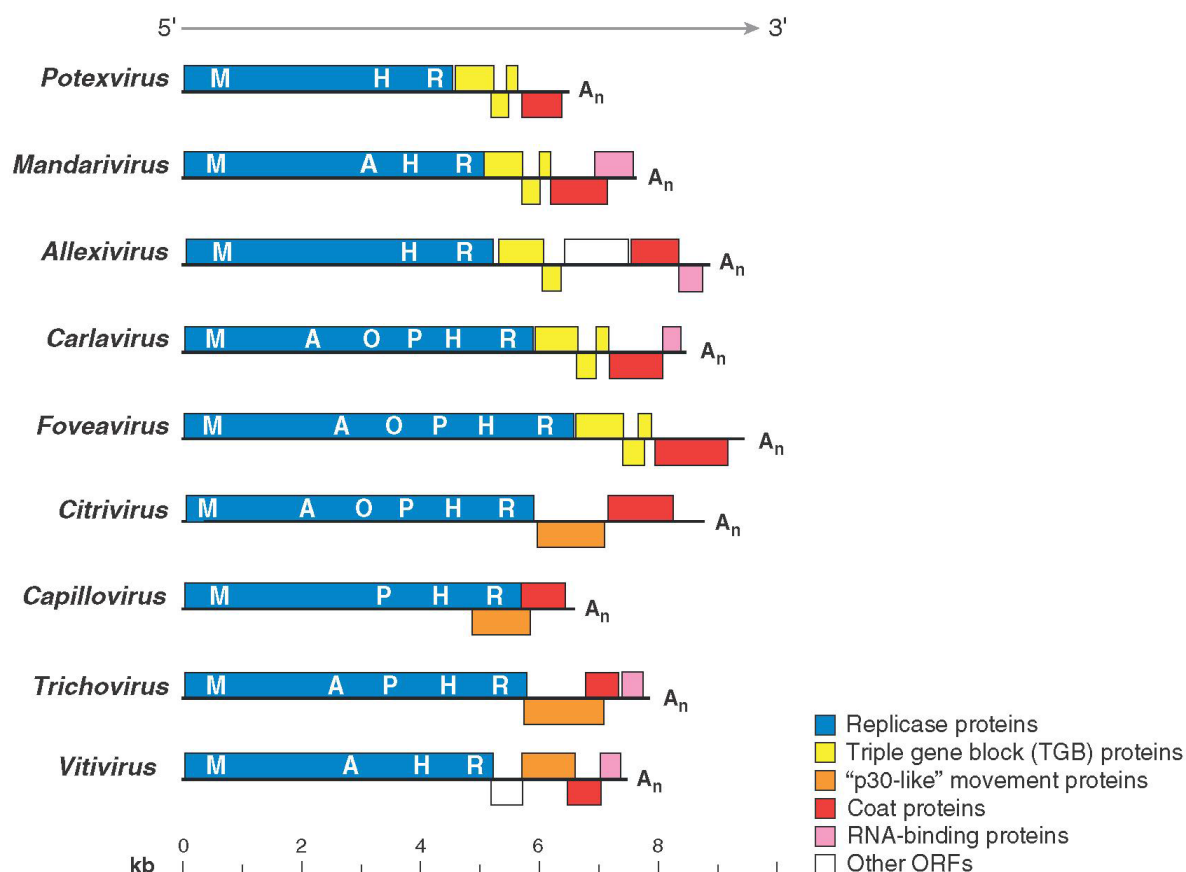


Рисунок 3. Сравнительная диаграмма организации вирусных геномов близких по своему строению к ХВШ. Блоками отмечены открытые рамки считывания (ORFs). Домены указаны буквами: Метилтрансферазный домен (М), AlkB-домен (А), ОТu-пептидазный домен (О), papain-like протеазный домен (Р), РНК -хеликазный (Н), и RDRP-полимеразный домен (R). (Martelli et. al., 2007).

2.4. Белки, кодируемые геном Х вируса шалота

Имеющиеся экспериментальные данные о биохимии и молекулярной биологии кодируемых Х вирусом шалота белков крайне ограничены. «Очевидно, что выявление функциональных особенностей геномов алексивирусов и ХВШ и кодируемых ими белков требует дальнейшей экспериментальной работы» (Архипов, 2013).

«Первая открытая рамка считывания ХВШ (в направлении 5'-3') кодирует полипептид с молекулярной массой около 190 кДа, образованный 1718-ю аминокислотами (Shallot virus X, NCBI GenBank: NC_003795.1)» (Архипов, 2013).

«N-концевой домен, судя по аминокислотной последовательности должен обладать потенциальной метилтрансферазной активностью, в средней части белка, прослеживаются последовательности аминокислот, характерные для NTP-азного/хеликазного домена, и в завершении, С-конец содержит консервативные последовательности соответствующие доменам РНК-зависимой РНК-полимеразы» (Калошин, 1999; Koonin and Dolja, 1993). Домен окислительной деметилазы (AlkB), расположен между метилтрансферазным и хеликазным доменами (Martelli et. al., 2007). Таким образом пептид кодируемый ОРС 1 включает 4 домена - метилтрансферазный (MET), домен окислительной деметилазы (AlkB), НТФазный/хеликазный домен (HEL) и домен РНК-зависимой РНК-полимеразы (POL), что позволяет сделать вывод о функционировании данного белка как вирусной РНК зависимой РНК полимеразы (репликазы). «Интересно, что такая доменная структура характерна для репликазы ХВШ, но не других вирусов данного рода» (Martelli et. al., 2007). Аналогичная ситуация встречается и в других родах нитевидных вирусов. Так у ряда представителей родов *Carlavirus* и *Potexvirus* AlkB-область обнаруживалась у некоторых, но не у всех вирусов этих родов (Bratlie и Drablos, 2005; Martelli et. al., 2007).

Конкурентоспособные преимущества вирусов, кодирующие AlkB домены не известны. Было отмечено, что AlkB домен обнаруживался главным образом у вирусов, заражающих древесные или многолетние растения, предположительно эта область может увеличивать стабильность РНК геномов во время длительной репродукции в единственном зараженном растении (Dolja et. al., 2006). Можно предложить, что отсутствие AlkB домена приводит к уменьшению стабильности генома и, как следствие, к явной разнородности алексивирусных геномов вирусов чеснока.

Исследование последовательностей репликаз алексивирусов позволило установить новые взаимосвязи в пределах семейства *Flexiviridae*, в результате чего, оно было разделено на семейства *Alphaflexiviridae* и *Betaflexiviridae* (Adams et. al., 2011).

Белок, кодируемый последовательностью ОРС 2 относящейся к так называемому тройному блоку генов, насчитывает 241 аминокислоту. (Shallot virus X, NCBI GenBank: NC_003795.1, Kanyuka, et. al., 1992). «Данный белок (ТБГ1 ХВШ), как и родственные ему белки других вирусов, в геноме которых присутствует ТБГ, включает семь консервативных мотивов, характерных для НТФазного/хеликазного домена что в сумме дает 39% общей длины белка» (Morozov, Solovyev, 2003). И таким образом, вероятно, является хеликазой.

Белок закодированный последовательностью ОРС 3 (ТБГ-2), также входящей в тройной блок генов включает 103 аминокислоты и, по-видимому, ответственен за межклеточный транспорт вируса (Shallot virus X, NCBI GenBank: NC_003795.1, Kanyuka et. al., 1992).

К сожалению, в литературе представлено ограниченное количество данных об этой группе белков. Установлено определенное сходство белков ТБГ-1 и ТБГ-2 тройного блока генов ХВШ и иных алексивирусов с ТБГ потексвирусов (Morozov, Solovyev, 2003). «Известно также, что ТБГ-2, кодируемый ОРС 3 геном другого вируса данного рода, Х-вируса чеснока, был детектирован в подвижных цитоплазматических гранулах неизвестной природы, ассоциированных с эндоплазматическим ретикуломом» (Архипов, 2013; Lu et. al., 2011).

Богатый серином белок молекулярной массой 42 kDa (p42) кодируемый открытой рамкой считывания 4 расположенной между генами ТБГ и белка оболочки, не имеет гомологов за пределами рода *Allexivirus*. (Kanyuka et. al., 1992).

Вероятно, ОРС 4 относится к категории ORFans. ORFans не обнаруживают сходства нуклеотидной последовательности с какими-либо последовательностями, представленными в известных базах данных. Хотя присутствие ORFans генов и кодируемых ими белков в организмах – естественное явление, подтвержденное многими наблюдениями, происхождение и функции данных белков продолжают оставаться тайной (Yin & Fischer, 2008). У близких алексивирусов, известных карла- и потексвирусов ОРС подобной четвертой открытой рамки считывания ХВШ не обнаружено, за областью, кодирующей ТГВ, следует последовательность гена белка оболочки (Martelli et. al., 2007).

Белок p42 состоит из трехсот восьмидесяти аминокислот. Выравнивание последовательности p42 ХВШ и его гомологов, кодируемых другими алексивирусами, показало три консервативных домена. Короткий консервативный домен (длинной 38 аминокислотных остатков) был найден на N-концевой области белка, тогда как домены В (68 остатков) и С (105 остатков) были расположены в центральном регионе и в С-конечной области, соответственно.

Анализ функционального значения такой организации р42 с тремя областями ждет дальнейших экспериментов (Shallot virus X, NCBI GenBank: NC_003795.1, Kanyuka et. al., 1992).

За тройным блоком генов у карла- и потексвирусов, и генами 32-42К белков у алексивирусов следует последовательность кодирующая ген белка оболочки (БО). Белок оболочки ХВШ насчитывает 262 аминокислоты (Shallot virus X, NCBI GenBank: NC_003795.1, Kanyuka et. al., 1992).

«При этом, С-концевая часть, включающая приблизительно 180 аминокислотных остатков имеет высокое сходство с карла- и потексвирусами (Kanyuka et. al., 1992), а N-концевые области протяженностью 60-70 остатков (около 1/4 последовательности) являются вариабельными, что характерно для нитевидных фитовирусов, например потивирусов (Koonin & Dolja, 1993). Последовательность белка оболочки ХВШ обладает высокой гомологией с последовательностями чесночных алексивирусов – более 50% аминокислотных остатков являются либо идентичными, либо гомологичными» (Калошин, 1999).

Расчетная молекулярная масса БО ХВШ составляет 28 кДа, однако у ХВШ наблюдается интересный феномен гетерогенности. Методами фракционирования белков по подвижности в полиакриламидном геле, и иммуоблотинга определяются две фракции БО массой 28 кДа и 37 кДа с преобладанием БО массой 37 кДа, в качестве мажорной фракции. (Vishnichenko, 1993; Kanyuka, 1992).

Последний (в направлении 5'-3') кодируемый ОРС 6 генома ХВШ цистеин богатый белок (ЦББ), массой 15 кДа, имеет в своем составе 128 аминокислот (Kanyuka et. al., 1992; Sumi et. al., 1993; Yamashita, 1996; Рябов и др., 1996; Song et. al., 1998).

«ЦББ сходен в аминокислотной последовательности с 12К белками карлавирусов, включающей участок богатый остатками аргинина и четыре консервативных остатка цистеина» (Калошин, 1999).

«Предполагается, что основной участок и следующие за ним четыре остатка цистеина 12К белков формируют так называемый «цинк-связывающий палец». Однако в аминокислотных последовательностях 15К алексивирусов расположение консервативных остатков цистеина и гистидина отличается от подобного расположения в 12К белках карлавирусов» (Калошин, 1999). «Вероятно, функции белка в определенной степени аналогичны 12К белку карлавирусов способному, как недавно показано, связывать нуклеиновые кислоты и участвовать в супрессии РНК-сайленсинга и регуляции экспрессии генов растения-хозяина» (Архипов, 2013; Senshu et. al., 2011).

Таким образом, можно утверждать, что геном Х вируса шалота кодирует следующие белки (в направлении 5'- 3'): Репликазный, белки тройного блока генов (ТБГ-1 и ТБГ-2), ORFan белок "Р42", белок оболочки и цистеин-богатый белок (Kanyuka et. al., 1992).

2.5. Синтез *in vitro* полноразмерной кДНК-копии геномной РНК ХВШ

Исследование этапов инфекционного процесса, сложных проблем взаимодействия вирус-хозяин, экспрессии вирусных генов и функций вирусспецифичных белков РНК-содержащих вирусов, как правило, предполагает получение полноразмерных к-ДНК копий вирусного генома. (Калошин, 1999).

Согласно Watson & Jackson, 1986, получение к-ДНК копии геномной РНК вируса, включает синтез «первой цепи к-ДНК в результате реакции обратной транскрипции, с использованием в качестве матрицы вирионной РНК. Затем с помощью ПЦР синтезируют вторую цепь с амплификацией продукта, используя при этом фланкирующие праймеры, после чего к-ДНК клонируется в подходящий вектор» (Калошин, 1999).

Впервые полноразмерную к-ДНК копию Х вируса шалота получили в 2000 г., сотрудники лаборатории молекулярной вирусологии ВНИИСБ.

«ПЦР-фрагмент X вируса шалота длиной около 9 kb встраивали в плазмиды Bluescript II KS- и pUC 19 по сайту рестрикции SmaI. Трансформацию проводили в клетки DH5 α . Отбор клонов осуществляли с помощью рестриктоного анализа и секвенирования по концевым последовательностям вставок» (Калошин, 1999).

«Клоны, имеющие на 5'-конце промотор T7 РНК-полимеразы и на 3'-конце поли (А) трек длиной 15 нуклеотидов (4 в pUC19, и 2 в Bluescript II KS-) были отобраны к дальнейшей работе» (Калошин, 1999).

Для терминации транскрипции ДНК матрицу линеаризировали со стороны 3'-конца транскрибируемой вставки. В случае клонов в pUC 19 транскрипты имели на 3'-концевой последовательности кроме пятнадцати нуклеотидов, принадлежащих вирусному, поли-(А) треку еще 201 невирусных нуклеотида. Клоны, полученные в Bluescript II KS- линеаризировали с добавлением 22 и 37 невирусных нуклеотида. «Таким образом, были отобраны клоны, концевые последовательности которых соответствуют концевым последовательностям геномной РНК» (Калошин, 1999).

«При использовании всех клонов, содержащих полноразмерную кДНК, выход РНК-транскриптов составлял, в среднем, 2 мкг на 1 мкг ДНК-матрицы. В процессе реакции осуществлялось кэпирование продуктов, поскольку наличие m⁷G(5')ppp(5')G является необходимым условием, обеспечивающим способность транскриптов индуцировать инфекционный процесс *in vivo*» (Калошин, 1999).

Полноразмерный клон 32-Е на основе вектора pUC 19, оказался наиболее инфекционным. (Vishnichenko et. al., 2000, 2001).

2.6. Инфекционные РНК-транскрипты полноразмерной кДНК-копии геномной РНК ХВШ в клетках перевиваемой линии клеток сахарной свеклы

«В качестве экспериментальной системы для исследования молекулярных механизмов инфекционного процесса вызываемого Х вирусом шалота было предложено использовать протопласты перевиваемой линии клеток сахарной свеклы трансфицированных транскриптами полноразмерной кДНК-копии генома ХВШ» (Калошин, 1999; Vishnichenko et. al., 2000, 2001).

«Выбор источника протопластов определялся доступностью материала и удобством манипуляций с ним, так как не ограничен природными хозяевами вируса поскольку в данном случае резистентность к вирусной инфекции проявляется только на организменном уровне». (Калошин, 1999).

«Перевиваемая линия клеток сахарной свеклы (штамм 2п) стабильно поддерживалась в Институте физиологии растений РАН в течение уже более 20 лет и при использовании стандартных методов позволяет получать жизнеспособные протопласты в практически неограниченных количествах вне зависимости от времени года» (Калошин, 1999).

«Протопласты получали из клеток сахарной свеклы, находящейся в середине логарифмической фазы роста» (Калошин, 1999).

«Протопласты сохраняли жизнеспособность, около 5 часов. Не менее 90% протопластов в суспензии оставалось интактными во время эксперимента» (Калошин, 1999).

Для инокуляции 0.7×10^6 протопластов использовали 10-20 мкг вирионной РНК и 150 мкг транскриптов. Меньшие концентрации не вызывали инфекцию.

«Как следует из результатов иммуноэлектронной микроскопии, в инокулированных протопластах синтезируется белок оболочки, и формируются вирусные частицы декорируемые антисывороткой против ХВШ» (Калошин, 1999).

«Таким образом, показано, что в протопластах перевиваемой линии клеток сахарной свеклы в результате инокуляции их транскриптами к-ДНК геномной РНК ХВШ инициируется нормальный инфекционный процесс, заканчивающийся формированием зрелых вирусных частиц. В дальнейшем подобная схема, то есть получение полноразмерной кДНК-копии геномной РНК ХВШ, синтез инфекционных транскриптов и создание эффективной модельной системы трансфекции протопластов сахарной свеклы позволит детально исследовать молекулярные механизмы репликации геномной РНК, экспрессии вирусных белков и эволюции ХВШ» (Калошин, 1999; Vishnichenko et. al., 2000, 2001).

2.7. Участие ORFan белка p42 в формировании вирионов ХВШ

ORFan белок p42 в детектируемых количествах обнаруживается в растениях, в которых присутствуют частицы ХВШ (Аршава и др., 1995). Связь данного белка с формированием вирионов X вируса шалота исследовалась в экспериментальной системе на основе клеточной культуры сахарной свеклы трансфецированных конструкциями экспрессирующими геномные РНК транскрипты X вируса шалота дикого и мутантного типов.

Мутантная геномная РНК ХВШ содержала нефункциональный белок p42, полученный методом мутации сдвига рамки считывания (frameshift mutation). Присутствие мутации в отобранных клонах проверяли рестрикционным анализом (Vishnichenko et. al., 2002).

В дальнейшем клеточная культура протопластов сахарной свеклы трансфицировалась конструкциями экспрессирующими геномные РНК транскрипты ХВШ дикого и мутантного типов.

Накопление белков анализировалось иммуноблоттингом и иммуноэлектронной микроскопией с антисыворотками относительно рекомбинантного капсидного белка (As37), 42K (As42) и 15 K (As15).

Детекция иммуноблоттингом показала присутствие 37K капсидного белка в препаратах, содержащих конструкции и дикого и мутантного типов. У капсидного белка ХВШ, из трансфецированных клеток сахарной свеклы, была более низкая электрофоретическая подвижность по сравнению с белком, взятым из экстракта лука-шалота, зараженного ShVX. Иммуноэлектронная микроскопия показала наличие вирусных частиц только в экстрактах протопластов инокулированных транскриптами дикого типа. Протопласты инокулированные транскриптами конструкций несущих мутантный р42 содержали агрегаты белка оболочки. Антисыворотка As15 не взаимодействовал с вирионом Х вируса шалота.

Таким образом мутация в ОРС 4 блокирующая экспрессию функционального р42 препятствовала формированию вирионов ХВШ. Молекулярный механизм этого все еще неясен. Возможно, 42K белок действует как кофактор взаимодействия белка оболочки вируса с геномной РНК во время сборки вириона. Молекулы р42 включены в зрелые вирионы. Иммуноэлектронной микроскопией показана локализация р42 на торцевых участках вириона ХВШ (Vishnichenko et. al., 2002).

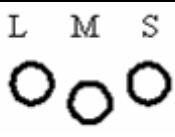
3. Эволюция аллексивирусов

3.1. Общие механизмы эволюции фитовирусов с РНК геномом

Эволюция фитовирусов, подчиняется общим закономерностям эволюционного процесса органической материи и функционирует в тесной взаимосвязи и взаимовлиянии с эволюцией хозяев (Duffy et. al., 2008). Взаимосвязь с эволюцией хозяев, необходимость обходить механизмы антивирусного фитоиммунитета привела к разным путям адаптации геномов растительных вирусов (Таблица 2).

Таблица 2. РНК-геномы некоторых родов фитовирусов.

Схема строения генома.	Указание к схематическому изображению.	Полярность	Представители
	Геномная РНК одноцепочечная, линейная. 5'-Кэп m ⁷ GppNp (где N — любой нуклеотид), как правило, m ⁷ GpppGr или m ⁷ GpppAp. 3'-тРНКподобная структура.	(+)	Тобамовирусы (TMV, вирус табачной мозаики)
	Геномная РНК одноцепочечная, линейная. 5'-терминальный белок, 3'-поли-А трек.	(+)	Потивирусы (PPV, Вирус шарки сливы)
	Геномная РНК одноцепочечная, линейная. 5' – Кэп, 3' - поли-А трек.	(+)	Потексвирусы (PVX, X вирус картофеля). Карлавирусы (PVM, M вирус картофеля)
	Геномная РНК одноцепочечная, линейная, сегментированная.	(+)	Кукумовирусы. (CMV, вирус огуречной мозаики)

	Геномная РНК одноцепочечная, линейная.	(-)	Нуклеорабдовирусы. (PYDV, вирус желтой карликовости картофеля). Циторабдовирусы (SCV, Вирус морщинистости земляники).
	Двухцепочечная, линейная, сегментированная (8-11 сегментов)	(-)	Фитореовирусы (RDV, вирус карликовости риса)
	Одноцепочечная, кольцевая, сегментированная (3 сегмента)	(-) М и S сегменты используют амбисенс стратегию транскрипции	Тосповирусы (TSWV, вирус пятнистого увядания томатов)

Так как описать направленность эволюционного процесса и особенности геномов всех фитовирусов не представляется возможным в контексте данной работы, в дальнейшем ограничимся обзором фитовирусов, геном которых представлен РНК плюс полярности, (+) РНК. В первую очередь интерес представляют аллексивирусы и фитовирусы, геном которых имеет явную гомологию с аллексивирусными геномами (карла- и потексвирусы).

Геном потекс- и карлавирuсов содержит несколько открытых рамок считывания, транслирующих вирусные белки с различной функцией.

5' – область геномной РНК кэпирована. Кэп представляет собой модифицированный рибонуклеотид (7-метилгуанозин), соединённый 5',5'-трифосфатным мостиком с первым нуклеотидом РНК. 3' – конец полиаденилирован.

Геном алексивирусов комбинирует особенности геномов потекс- и карлавирусов. В частности, 5'- область генома X вируса шалота прототипа рода *Allexivirus* сходна по строению с 5'- областью генома потексвирусов, тогда как 3'- геномная область ХВШ, напротив, сходна по строению с 3' областью карлавирусов (Kanyuka et. al., 1992).

Особенностью эволюции вирусов, в том числе фитовирусов с (+) РНК геномами, являются, большие размеры популяций при малом времени смены поколений, высокие темпы накопления мутаций, дрейф генов и высокая частота рекомбинаций при смешанной инфекции (Duffy et. al., 2008). В равной степени это справедливо и для карла-, потекс- и аллексивирусов.

Дрейф генов - медленные продолжительные изменения в геноме в популяции в ряду поколений под действием случайных (стохастических) факторов в условиях большого количества мутаций при транскрипции генетической информации.

Уровень мутаций вирусного РНК генома составляет, как правило, 0.4 - 1.1 нуклеотидных мутаций на геном (Drake and Holland, 1999). Такой уровень мутаций, по крайней мере, в 100 раз выше, чем уровень мутаций характерный для вирусов с ДНК геномом и бактерий и объясняется неспособностью РНК зависимой РНК полимеразы исправлять ошибки репликации (Steinhauer, 1992).

Продолжительные и случайные изменения, заключающиеся во вставке неправильного основания, в произвольном участке гена приводит к изменению кодируемого им белка (обычно замена одной или нескольких аминокислот), что может повлиять на эффективность инфекционного процесс.

Копирование ошибок в процессе репликации вызывает изменения в естественной популяции фитовирусов, приводящие, например, к увеличению патогенности или преодолению факторов фитоиммунитета (Escriu et. al., 2003).

С другой стороны, дрейф генов и большое количество мутаций способно приводить к функционально значимым ошибкам генома или их негативному фенотипическому проявлению. Фитовирусы способны компенсировать подобное негативное воздействие заменяя участки генома на гомологичные последовательности используя молекулярные механизмы процесса РНК-рекомбинации (Lai, 1992; Nagy and Simon, 1997).

РНК рекомбинация – процесс образования новых (дочерних) последовательностей РНК из двух или нескольких предшествующих (родительских) молекул РНК, включающий различные перестройки РНК-геномов (вставки, делеции, образование химерных молекул и др.). Таким образом, наравне с репаративной функцией механизм РНК - рекомбинации является движущей силой эволюционных изменений вирусной популяции (Bujarski, 2013).

«Первые биохимические доказательства вирусной РНК-рекомбинации были получены в результате анализа белков рекомбинантных вирусов полиомиелита (Romanova et. al., 1980) и вируса ящура» (King et. al., 1988).

«У фитовирусов с (+) РНК геномом РНК-рекомбинация впервые показана при исследовании вируса мозаики костра семейства бромовирусы (Bujarski and Kaesberg, 1986) и относящегося к кармовирусам вируса скрученности турнепса» (Cascone et. al., 1990).

Молекулярные механизмы, обуславливающие РНК рекомбинацию у фитовирусов, на данный момент еще не установлены полностью. Репликативная модель рекомбинации РНК предполагает различные перестройки молекул РНК обусловленные способностью РНК-зависимой РНК-полимеразы менять матрицу при репликации родительских геномов.

«Репликативная модель РНК-рекомбинации предполагает непосредственное участие вирусной РНК-полимеразы, что было показано при исследовании вируса полиомиелита» (Cooper et. al., 1974). А также вируса мозаики костра (Nagy and Bujaski, 1995).

«Нерепликативная модель, или модель «разрыв-лигирование» допускает осуществление рекомбинации между молекулами РНК без участия РНК-зависимой РНК-полимеразы за счет разрывов в предварительно синтезированных родительских молекулах РНК одних межнуклеотидных ковалентных связей и образования новых в дочерней молекуле РНК» (Bujarski, 2013).

«Рекомбинация, обусловлена расположением мест перекреста на протяженных участках с высокой степенью гомологии. Образование вирусов с новыми фенотипическими признаками посредством генетической РНК-рекомбинации, вероятно, идет по блочному способу, за счет передачи друг другу функционально значимых модулей» (Lai, 1992). Модульный обмен характерен, например, для рекомбинации лютеовирусов (Pagan and Holmes, 2010). Широко представлена рекомбинация РНК в пределах естественных популяций семейства Potyviridae. (Bousalem et. al., 2000; Yamasaki et. al., 2010). Кроме того, рекомбинантные гены отмечены в геномах вирусов семейства Closteroviridae и Bromoviridae (Moonan et. al., 2000).

Частота рекомбинации, по-видимому, зависит от протяженности и степени гомологии предполагаемых сайтов родительских РНК, что было отмечено у бромовирусов (Nagy and Bujaski, 1995, Bruyere et. al., 2000) и потивирусов (Varrelmann et. al., 2000). Известно о рекомбинации у близких к алексивирусам по строению 3' области генома карлавирусов. Впервые обнаружена рекомбинация обыкновенного латентного вируса чеснока (GarCLV), причем, по-видимому, точки перекреста распределены по последовательности гена капсидного белка (Pramesh et.al., 2013).

Так же сообщалось о рекомбинациях капсидного белка В вируса хризантемы (Singh et.al., 2007) и бессимптомного вируса лилий (Singh et.al., 2012).

Анализ рекомбинантного вируса PepMV-US2 мозаики томата представителя потексвирусов близких алексивирусам по строению 5' области генома напротив показал что рекомбинация произошла по генам кодирующим белки РНК зависимой РНК полимеразы и ТБГ 1 (Hasiow-Jaroszewska et. al, 2010).

Данные о возможных точках рекомбинации алексивирусов в литературе не представлены. Учитывая, что геном алексивирусов комбинирует особенности геномов потекс- и карлавирусов, вопрос о возможном возникновении алексивирусов как рекомбинантов этих вирусов остается открытым.

Известно, что на рекомбинацию вирусных генов могут оказывать влияние клеточные факторы организма хозяина, например установлено взаимодействие обладающего (+) РНК геномом вируса кустистой карликовости томатов (TBSV) с клеточными факторами дрожжей, подавляющими или инициирующими рекомбинацию РНК TBSV (Serviene et. al., 2005; Nagy, 2011).

Очевидно, что взаимовлияние с организмом хозяина и взаимосвязь с его эволюцией может приводить к эволюционной дистанции между популяциями вирусов персистирующих в разных географических зонах. Например, филогенетический анализ, проведенный для индийской популяции латентного вируса чеснока и еще 37 изолятов этого карлавируса, показал формирование двух филогенетических подгрупп. Индийский изолят, сформировал собственный кластер и группировался с латентным вирусом лука-шалот (SLV) и десятью другими видами карлавирусов. Оставшиеся 26 видов карлавирусов группировалось в отдельной группе.

В современный период темпы эволюции фитовирусов еще более ускорились в результате усиливающегося давления антропогенных факторов (Новикова, 2007). Темпы эволюционных изменений алесивирусных геномов требуют дополнительных исследований, однако развитие методов секвенирования геномов, все большее удешевление данных технологий позволяет интенсифицировать работы, направленные на исследование эволюционной геномики этих фитовирусов. Интересно было бы узнать уровень накопления мутаций X вируса шалота – прототипа алесивирусов персистирующего в течение длительного времени в одной географической зоне.

3.2. Концепция вирусного квазивида

«Модель квазивидов была предложена Эйгеном в начале 1970-х годов. Эта модель описывает эволюцию популяции макромолекул РНК, кодирующих наследственную информацию» (Редько, 2020). «При размножении молекул РНК происходит копирование наследуемой информации. Ошибки в процессе копирования приводят к мутациям РНК. Эволюция популяции приводит к отбору квазивида – такого распределения цепочек РНК, в которое входит как "наилучшая РНК", размножающаяся с максимальной скоростью, так и близкие к ней цепочки, отличающиеся от этой наилучшей мутационными заменами» (Редько, 2020).

«Характер эволюции существенно зависит от численности популяции n .

Если n очень велико ($n \gg 2^L$), то численности особей каждого вида можно рассматривать как большие числа, а эволюцию – как детерминированный процесс (2^L – общее число различных цепочек длины L с двоичными символами). В этом случае эволюционная динамика популяции может быть описана системой обыкновенных дифференциальных уравнений, методы исследования которых хорошо известны» (Редько, 2020).

«Показано, что в отсутствие мутаций происходит отбор особи, имеющей наибольшую приспособленность, а при наличии мутаций в результате эволюции формируется квазивид» (Редько, 2020).

«Одна из содержательных интерпретаций модели квазивидов – эволюция полинуклеотидных цепочек РНК. Такая эволюция могла иметь место на самых начальных этапах происхождения жизни. Цепочки РНК могли самореплицироваться, однако точность копирования примитивных полинуклеотидов была мала, поэтому длина таких цепочек могла быть только небольшой. Эйген и Шустер (Эйген и Шустер, 1982) предложили модель гиперциклов, в которой к цепочкам РНК добавляются ферменты, которые выполняют определенные каталитические функции и вместе с цепочками РНК формируют целостную систему кооперативно взаимодействующих макромолекул. Ферменты могли способствовать повышению точности копирования, в результате количество информации, которое такие примитивные “особи” могли передавать потомкам, возрастало» (Редько, 2020).

«Модель гиперциклов интерпретирует гипотетическую стадию эволюции, которая могла следовать за квазивидами» (Редько, 2020).

«В гиперцикле РНК и ферменты кооперируются следующим образом: имеются РНК-цепочки (I_i); i -я РНК кодирует i -й фермент E_i ($i = 1, 2, \dots, n$); ферменты циклически катализируют репликацию РНК, а именно E_1 способствует репликации I_2 , E_2 способствует репликации I_3 , ..., E_n способствует репликации I_1 » (Редько, 2020).

«Кроме того, упомянутые макромолекулы кооперативно обеспечивают примитивную трансляцию, так что информация, закодированная РНК цепочками, транслируется в структуру ферментов, аналогично обычному механизму трансляции в биологических клетках» (Редько, 2020).

Схема гиперцикла представлена на рис. 4.

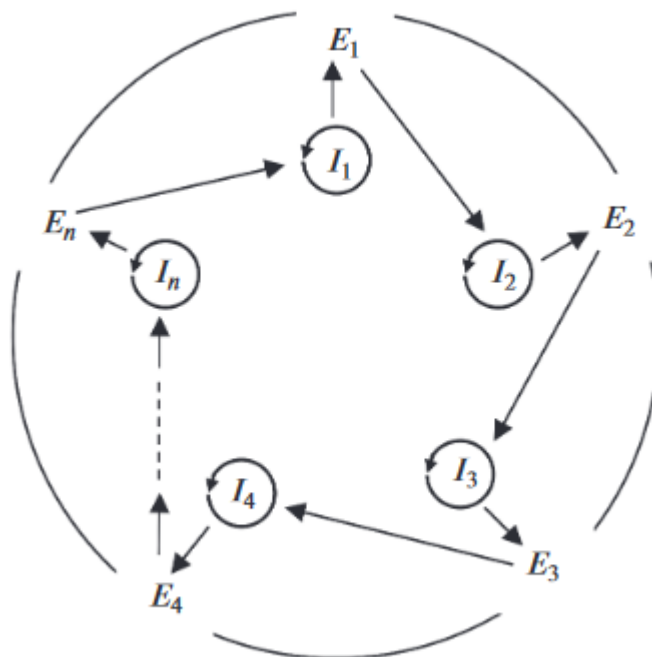


Рисунок 4. «Структура гиперцикла. I_i – РНК-цепочки, E_i – ферменты репликации ($i = 1, 2, \dots, n$)» (Редько, 2020).

«Таким образом, рассмотренные модели характеризуют постепенно усложняющиеся макромолекулярные предшественники биологических организмов, возникающих в процессе эволюционной адаптации к переменной внешней среде» (Редько, 2020).

«Квазивиды характеризуют эволюцию простых информационных единиц – РНК-цепочек небольшой длины» (Редько, 2020).

«Гиперциклы – это макромолекулярные системы, учитывающие кооперацию цепочек РНК с простейшими ферментами, кодируемыми этими цепочками» (Редько, 2020).

Модель квазивидов была использована применительно к РНК содержащим вирусам и предложен термин вирусный квазивид (Nowak, 1992; Domingo and Holland, 1997).

Первое исследование, посвященное количественному описанию вирусного разнообразия, было проведено на модели бактериофага Q-бэта. Согласно исследованию, популяция Q бета-фага находится в динамическом равновесии, при этом, с одной стороны, в вирусной популяции, с высокой скоростью, возникают жизнеспособные мутации, а, с другой стороны, популяция подвергается сильному эволюционному отбору.

Таким образом, геном Q бета-фага нельзя описать как определенную уникальную структуру, а скорее, как средневзвешенное значение большого числа различных индивидуальных последовательностей. (Domingo, 1978)

На данный момент, при описании спектра популяции вируса, в следствии его генетической разнородности, предпочтительно использовать термины: облако мутантов, рой, или вирусный квазивид.

Действительно в природе генетическая разнородность популяций вирусов обеспечивает преимущество в ходе естественного отбора. Генетическое разнообразие выгодно, когда вирус сталкивается с различными факторами давления естественного отбора (Iwasa et. al., 2004). Условия естественного отбора могут измениться, например, после заражения нового хозяина с иной иммунной реакцией (Pybus and Rambaut, 2009), заражения различных типов клеток, в результате влияния различных химических веществ и т.д. (Ojosnegros et. al., 2010).

Разнородность является следствием подверженной ошибкам вирусной репликации, и подтверждается с тех пор и при использовании других вирусных систем. По сравнению с ДНК-полимеразами, имеющими способность к исправлению ошибок, но все равно допускающими их – примерно одна ошибка на $10^7 - 10^9$ полимеризованных нуклеотидов, РНК-полимеразы РНК-вирусов совершают одну ошибку на каждые 1000 – 100000 полимеризованных нуклеотидов.

К тому же эти ферменты делая ошибки, не могут исправлять их, поэтому мутации остаются во вновь синтезированной РНК.

С учетом того, что геном типичной вирусной РНК насчитывает 10000 оснований, частота 1 к 10000 соответствует в среднем одной мутации на каждый воспроизведенный геном. Если единичная клетка, инфицированная вирусом, производит 10000 новых вирусных частиц, то в теории по этому коэффициенту ошибок будет произведено 10000 новых вирусных мутантов. Такой огромный уровень мутации объясняет, почему РНК-вирусы развиваются так быстро (Новикова, 2007).

Таким образом, вирусные популяции не состоят из единообразных составляющих с определенной последовательностью нуклеиновой кислоты, скорее, они являются динамичными распределениями неидентичных, но родственных членов, вирусных квазивидов. Вирусный квазивид – полиморфные популяции одного вирусного вида, набор нескольких линий, генетически взаимодействующих и поддерживающих друг друга (Beerenwinkel, 2011).

Классическое же определение видов – популяция особей сходных по морфологическим, биохимическим и генетическим признакам, занимающих естественный ареал – не имеет смысла в отношении вирусов.

Потомство, возникающее после инфицирования, появляется благодаря избирательным силам, действующим внутри инфицированного хозяина. Вирионы, выходящие для инфицирования нового хозяина, представляют собой устоявшуюся популяцию вирусного квазивида, состоящего из огромного числа частиц, прошедших естественный отбор. И таким образом логично предполагать, что большинство вирусных инфекций запускается не единичным вирионом, а популяцией частиц квазивида (Келдыш, 2003).

Вторым выводом из концепции квазивида является то, что хотя каждый вирион внутри квазивида отличается по нуклеотидному составу от других, тем не менее испытывающие одинаковое давление естественного отбора в организме хозяина последовательности геномов популяции РНК-вирусов могут быть собраны вокруг консенсуса средней последовательности. Это означает, что последовательности вирусов, указанные в NCBI или иных базах данных, представляют консенсус, но не представляют конкретную последовательность с набором мутаций характерных только для нее. До недавнего времени было невозможно определить последовательности всех вирусных геномов, присутствующих в популяции, однако развитие методов глубокого секвенирования (например, 454 пиросеквенирования) сделало возможным изучение вирусных квазивидов.

3.3. Эволюционные взаимосвязи в пределах рода *Allexivirus*

Согласно предложенной классификации Международного комитета по таксономии вирусов, на данный момент, род *Allexivirus* включает 13 видов: X вирус шалота (прототип рода) и вирусы чеснока {группы А-, В-, С-, D-, Е-Х-} выделенные в подрод *Acarallexivirus*, и отдельные виды вирусов такие как Garlic mite-borne filamentous virus; Alfalfa virus S; Arachis pintoi virus; Blackberry virus E; Senna severe yellow mosaic virus; Vanilla latent virus. (ICTV, Virus Taxonomy: 2022 Release).

Последовательности геномной РНК вирусов подрода *Acarallexivirus* депонированы в базе данных национального центра биотехнологической информации США (NCBI GenBank). Большинство представленных последовательностей установлены секвенированием методом Сенгера, что не позволяет, в отличие от NGS технологии, выявить все гаплотипы, присущие тому или иному вирусному квазивиду (Таблица 3).

Таблица 3. Виды алексивирусов подрода *Acarallexivirus*.

Сокращениями обозначены, белки тройного блока генов (ТБГ), белок оболочки (БО) и цистеин богатый белок (ЦББ).

	ORF1 (ревертаза)	ORF2 (ТБГ-1)	ORF3 (ТБГ-2)	ORF4 (p42)	ORF5 (БО)	ORF6 (ЦББ)
Х вирус шалота	1718 aa	241 aa	103 aa	380 aa	262 aa	128 aa
А вирус чеснока (Изолят GarVA-SP)	1612 aa	250 aa	103 aa	366 aa	252 aa	128 aa
В вирус чеснока (Изолят IR-Go12)	1531 aa	246 aa	106 aa	357 aa	244 aa	127 aa
С вирус чеснока	1550 aa	244 aa	103 aa	367 aa	259 aa	128 aa
Д вирус чеснока (Изолят GarVD-SW9)	1561 aa	237 aa	103 aa	363 aa	250 aa	128 aa
Е вирус чеснока	1557 aa	244 aa	103 aa	364 aa	316 aa	127 aa
Х вирус чеснока	1543 aa	234 aa	106 aa	288 aa	243 aa	127 aa

Поражающие двудольные растения два вида вирусов (вирус мозаики белого ясеня и вирус эскобарии) могут рассматриваться как кандидаты на включение в род *Allexivirus* наряду с Е вирусом ежевики, так как обладают (с определенными вариациями) характерными чертами присущими алексивирусным геномам (Sabanadzovic et. al., 2011; Machado, 2006; Dutta et. al., 2013).

Описан также ряд переносимых клещами и поражающих растения рода *Allium* вирусных изолятов со сходным строением генома, (Chen et. al., 2001; Van Dijk et. al., 1991; Barg et. al., 1997) и, вероятно, представляющих собою штаммы тех или иных алексивирусов.

Все определенные виды алексивирусов имеют общий план строения генома. При этом в геномах ХВШ и алексивирусов чеснока отсутствует иницирующий кодон AUG в ОРС, кодирующей белок ТБГ3 тройного блока генов.

Сохранение нуклеотидной последовательности соответствующей гену ТБГЗ, но не имеющей иницирующего кодона, вероятно, каким-то образом влияет на адаптацию вируса к хозяину и, возможно, является следствием эволюционных изменений направленных на закрепление полезных для вирусов особенностей.

Аналогичная ситуация наблюдается у двух потексвирусов: X вируса лилии (Lily virus X) и вируса умеренной желтизны краев листьев земляники (Strawberry mild yellow edge-associated virus). Предположительно алексивирусы могут использовать для экспрессии неканонический иницирующий кодон (Memelink et. al., 1990; Jelkmann et. al., 1992).

Высокая консервативность открытых рамок считывания пять и шесть, и аминокислотных последовательностей кодируемых ими белков позволяет установить эволюционную дистанцию между видами рода *Allexivirus*. Так анализ последовательности ОРС 5 индийского изолята X вируса шалота кодирующей белок оболочки выявил 79-80% сходства с последовательностями ОРС 5 русского и новозеландского изолятов ХВШ и 66-76% соответствия с алексивирусами чеснока.

Гомологичность аминокислотных последовательностей составляла 85-88% для ХВШ и 54-61% с другими алексивирусами. Согласно BLAST анализу аминокислотная последовательность белка оболочки принадлежит семейству белковых последовательностей pfam0286, входящих в суперсемейство Flexi_CP cl02836, включающей также аминокислотные последовательности белков оболочки потекс - и карлавиров.

Гомология нуклеотидных последовательностей кодирующих цистеинбогатый белок составляет 85% для ХВШ индийского и русского изолятов и 68-76% с алексивирусами чеснока.

Аминокислотная последовательность ЦББ содержит мотив CFDCGAYLYDNHVCKRFTSLSSSDCLSVIH присутствующий у вирусов родов *Allexivirus*, *Carlavirus*, *Mandarivirus*, и *Vitivirus*.

Результаты анализа эволюционных расхождений последовательностей белка оболочки и цистеинбогатого белка, в пределах рода *Allexivirus* показала, что виды этого рода формируют три кластера (рис 5).

В - и Х- вирусы чеснока формировали первый кластер, тогда как А -, Е-, и D- вирусы чеснока второй. Третий кластер образовывали только изоляты Х вируса шалота. С-вирус чеснока не входил ни в один из предыдущих кластеров и, по-видимому, развивался отдельно (Majumder, Baranwal, 2011).

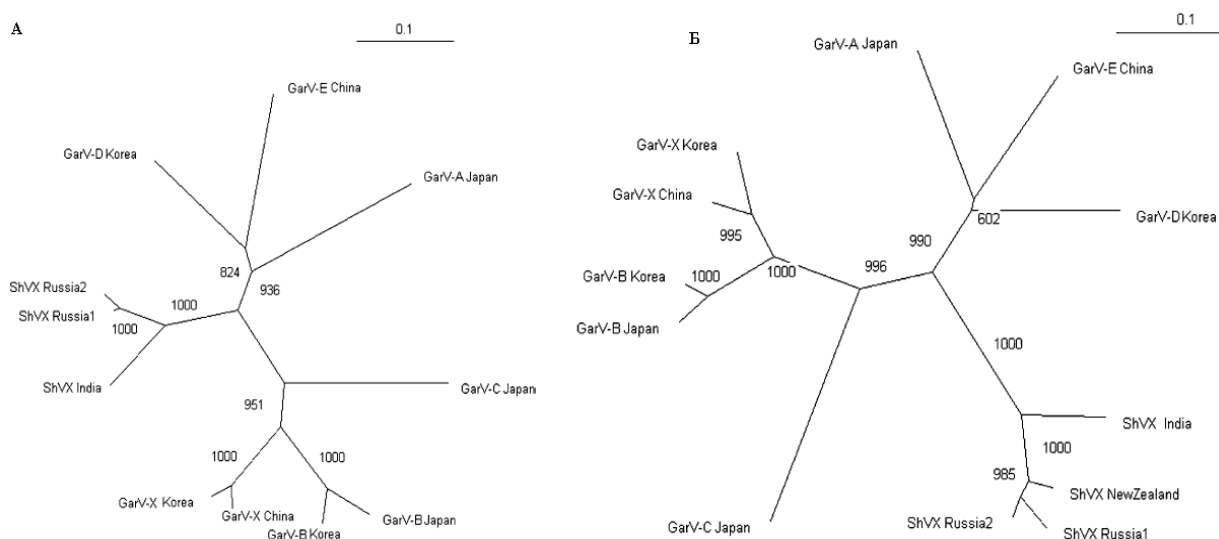


Рисунок 5. Дендрограммы эволюционных расхождений ХВШ и остальных алексивирусов. (А) Дендрограмма эволюционных расхождений ХВШ и остальных алексивирусов основанная на анализе аминокислотных последовательностей цистеинбогатого белка. (Б) Дендрограмма эволюционных расхождений ХВШ и остальных алексивирусов основанная на анализе аминокислотных последовательностей белка оболочки (Majumder, Baranwal, 2011).

Что касается ряда переносимых клещами и поражающих растения рода *Allium* вирусных изолятов со сходным алесксивирусам строением генома, то согласно критериям демаркации вирусных видов (Adams et. al., 2004), их можно рассматривать как штаммы тех или иных видов алесксивирусов.

Так сходство нуклеотидной последовательности японского вируса чеснока и D- вируса чеснока составляет 96% и таким образом данный вирус, является штаммом D- вирус чеснока (Chen et. al., 2001). Соответствие нуклеотидных последовательностей С-вируса чеснока и переносимого клещом нитевидного вируса чеснока (GarMbFV) составляет 99% (Yamashita et. al., 1996). Это позволяет считать этот вирус одним из штаммов С-вируса чеснока, что, очевидно, противоречит предложению Международного комитета по таксономии вирусов рассматривать «переносимый клещом нитевидный вирус чеснока» (GarMbFV) в качестве отдельного вида в составе рода *Allexivirus*.

Переносимый клещем нитевидный вирус чеснока, описанный в Аргентине, по-видимому, является штаммом А-вируса чеснока (Chen et. al., 2001). Переносимый клещом латентный вирус лука (OMbLV) и переносимый клещом латентный вирус лука-шалот (SMbLV), следует рассматривать как штаммы X вируса шалота (Van Dijk et. al., 1991; Barg et. al., 1997).

Вирус мозаики белого ясеня и вирус эскобарии поражающие двудольные растения имеют общий план строения генома и явную гомологию с алесксивирусами, например с Е вирусом ежевики.

Геном Е вируса ежевики (BVE), насчитывает 7718 нуклеотидов и содержит 5 открытых рамок считывания. В филогенетическом анализе аминокислотные последовательности репликаз Е вируса ежевики и алесксивирусов чеснока формируют общий кластер.

Аналогично алесксивирусам в геноме Е вируса ежевики, в открытой рамке считывания предположительно кодирующей белок ТБГЗ, отсутствует иницирующей кодон AUG (Sabanadzovic et. al., 2011). Открытая рамка

считывания 4 вируса Е ежевики, как и у алексивирусов чеснока кодирует белок р40 (гомолог белка р42 у ХВШ). ОРС 6, характерная для классифицированных алексивирусов, транслирующая цистеинбогатый белок, у данного вируса отсутствует.

Геном вируса мозаики белого ясеня представлен депонированными в базе данных NCBI последовательностями (номера: NC_011533 и GU906791) с отличающейся информацией о наличии иницирующего кодона AUG в ОРС кодирующей белок ТБГЗ. И таким образом затруднительно установить действительно ли присутствует иницирующий кодон AUG в ОРС кодирующей белок ТБГЗ. Так же как и у Е вируса ежевики в геноме вируса мозаики белого ясеня отсутствует открытая рамка считывания 6 (Machado, 2006).

Геном вируса кактуса эскобарии (*Escobaria missouriensis*) представлен неполной последовательностью, содержащей 2627 нуклеотидов, что соответствует аминокислотным последовательностям ТГБ1, ТГБ2, ТГБ3, серин-богатого белка р40 и белка оболочки. В геноме этого вируса открытая рамка считывания тройного блока генов, кодирующая белок ТГБ3, имеет иницирующий кодон AUG (Dutta et. al., 2013).

Таким образом, в пределах рода *Allexivirus*, очевидно наличие двух групп вирусов: (1) вирусы, поражающие однодольные и (2) вирусы поражающие двудольные растения, что можно рассматривать как результат адаптации эволюционных предшественников современных алексивирусов, к репродукции в тех или иных видах.

В целом, необходимо отметить, что исследование таксономии и филогенеза алексивирусов в настоящее время находится в ювенильном состоянии.

4. РНК-интерференция как форма антивирусного фитоиммунитета

4.1 Молекулярные механизмы РНК – интерференции как пост–транскрипционного генного сайленсинга

В самой общей форме экспертное определение феномена РНК-интерференции звучит следующим образом:

"Definitions. RNA interference (RNAi) is a mechanism that inhibits or activates gene expression at the stage of translation or by hindering the transcription of specific genes. RNAi targets include RNA from viruses and transposons (a form of innate immune response), and also plays a role in regulating development and genome maintenance. Small interfering RNA strands (siRNA) are key to the RNAi process, and have complementary nucleotide sequences to the targeted RNA strand. Specific RNAi pathway proteins are guided by the siRNA to the targeted messenger RNA (mRNA), where they “cleave” the target, breaking it down into smaller portions that can no longer be translated into protein. A type of RNA transcribed from the genome itself, microRNA (miRNA), works in the same way". (shRNA library - Rigel Pharmaceuticals, Inc. United States. Patent 7863222.)

Таким образом, принимая во внимание определение РНК-интерференции (RNAi) как механизма, ингибирующего экспрессию генов на стадии трансляции или препятствующего транскрипции определенных генов, нам представляется важным подчеркнуть то обстоятельство, что РНК-интерференция рассматривается, между прочим, как форма врожденного иммунитета.

В настоящем обзоре рассматривается только та совокупность молекулярных механизмов (pathway) РНК-интерференции (одна из нескольких), которая определяет этот феномен как пост-транскрипционный генный сайленсинг (post transcriptional gene silencing, PTGS) – пост-транскрипционный процесс, индуцированный двуцепочечными РНК и приводящий к сайленсингу генов, строго обусловленному гомологией нуклеотидных последовательностей.

Индукцированный РНК транскрипционный сайленсинг (RNA-induced transcriptional silencing, RITS) - та форма РНК-интерференции, при которой малые интерферирующие РНК участвуют в регуляции транскрипции определенного гена или геномного локуса, а также процессы, в которых участвуют микроРНК (в том числе, и вирусспецифичные) в настоящем обзоре не рассматриваются.

Биологические процессы, основанные на механизме РНК-интерференции, происходят в организмах всех эукариот: животных, простейших, грибов и растений (Lohmann et. al., 1999, Hannon, 2002; Aravin et. al., 2003; Mello, 2004).

Термин РНК интерференция был предложен Эндрю Файером и Крейгом Мелло для описания механизма сайленсинга генов в *Caenorhabditis elegans* (Fire et. al., 1998). «На модели нематоды *C. Elegans*, исследователями показано, что молекулы двуцепочечной РНК (дцРНК), способны эффективно подавлять экспрессию гомологичных по нуклеотидной последовательности генов» (Кленов, 2005). В 2006 году исследователям присуждена Нобелевская премия в области физиологии и медицины.

Ради исторической справедливости необходимо указать, что за несколько лет до работы Файера и Крейга в 1990 году, явление РНК-интерференции, названное авторами ко-супрессией, установлено в экспериментах по изменению окраски цветков петунии *Petunia hybrida*. (Napoli et. al., 1990).

«В растения были введены гены синтетазы розового и фиолетового пигментов. Однако повышение экспрессии гена синтетазы пигмента не привело к проявлению более тёмной окраски околоцветника, напротив, цветки стали более светлыми и даже частично белыми. Полученные результаты свидетельствовали о том, что активность фермента не растёт, а снижается. Гены синтетазы пигмента экспрессировались на более низком уровне, чем до введения трансгена» (2013; Napoli et. al., 1990).

Выводы данной работы в дальнейшем подтверждены другими исследователями. «Общий уровень экспрессии трансгенов может резко снижаться или даже полностью подавляться при увеличении числа их копий в геноме» (Van der Krol et. al., 1990). «Если трансгены гомологичны собственному гену организма (эндогену), то экспрессия последнего также подавляется» (Baulcombe, 2004). Для описания наблюдаемого механизма предложен термин ко-супрессия. (Napoli et. al., 1990)

На данный момент термин редко используется для описания процессов РНК-интерференции в растениях и является синонимом РНК-интерференции. (Кленов, 2005).

Современная модель базового процесса РНК-интерференции включает несколько стадий (рис 6).

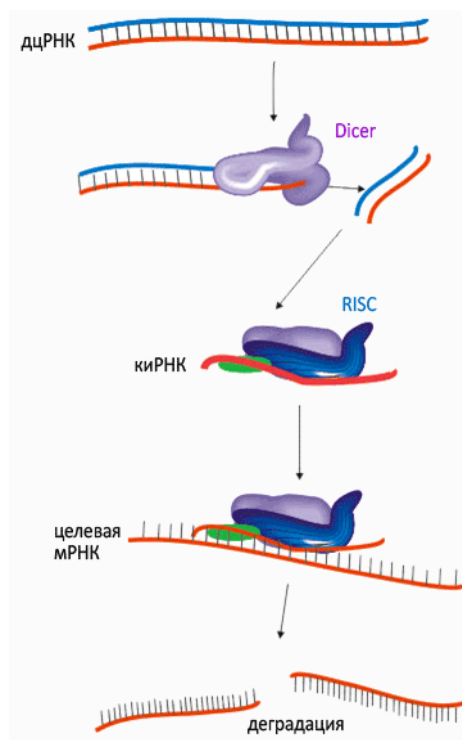


Рис. 6. Общая схема РНК-интерференции.

«На первой стадии, протяженная двуцепочечная РНК (дцРНК) подвергается процессингу с образованием малых РНК дуплексов длиной 20-25 н.п., при помощи белка Dicer (RNaseIII)» (Кленов, 2005).

Двуцепочечная РНК в клетке может возникнуть в результате различных молекулярно-биологических процессов, например, репликации вирусов или транскрипции инвертированных повторов трансгенов и транспозонов (Aravin et. al., 2003). «Эндогенная дцРНК образуется при двунаправленной транскрипции транспозонов (показано для растений и животных), из протяженных рибонуклеиновых шпилечных структур и перекрывающихся транскриптов мРНК (дрозофила, млекопитающие) и в результате активности РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) (нематода, растения, дрожжи)» (Carthew and Sontheimer, 2009; Golden et. al., 2008).

«Экзогенная дцРНК может образовываться в качестве промежуточного продукта в процессе репликации ДНК - и РНК - содержащих вирусов» (Логашенко, 2006).

Белок Dicer, представляет собой рибонуклеазу семейства РНКаз III, расщепляющую протяженную дцРНК на короткие, 19-23 нуклеотидные РНК-дуплексы с фосфорилированным нуклеотидом на 5' конце и не фосфорилированными, выступающими двумя нуклеотидами на 3' конце (Bernstein et. al., 2001).

Вторая стадия характеризуется расхождением РНК-цепей полученных дуплексов, при этом одна из цепей включается в белковый комплекс RISC (RNA-induced silencing complex), который, по принципу комплиментарности, эффективно определяет потенциальные РНК - мишени.

«В состав RISC, непосредственно осуществляющего расщепление мРНК-мишени, входит только одна из двух цепей коротких, интерферирующих РНК («ведущая» цепь siРНК), оставшаяся цепь подвергается деградации» (Логашенко, 2006; Schwarz et. al., 2002).

«Выбор цепи, которая будет включаться в RISC, определяется термодинамическими особенностями расплетания дуплекса» (Кленов, 2005; Khvorova et. al., 2003).

«Для расплетания дуплекса с разных концов затрачивается разная энергия. Выбор цепи осуществляется в пользу той одноцепочечной РНК, 5' конец которой находится со стороны дуплекса, наиболее энергетически выгодной для расплетания» (Кленов, 2005; Khvorova et. al., 2003; Schwarz et. al., 2002).

На завершающем этапе, одноцепочечная РНК (ssRNA), называемая ведущей нитью, по принципу комплементарности направляет эндонуклеазу присутствующую в RISC (белок Argonaute), обеспечивая расщепление мРНК. «Одноцепочечная короткая РНК в составе RISC узнает гомологичную мРНК, после чего RISC разрезает мишень ровно посередине участка комплиментарности между siРНК и мРНК» (Кленов, 2005; Elbashir et. al., 2001).

«Именно одноцепочечная малая РНК, входящая в состав комплекса RISC, определяет специфичность расщепления мРНК-мишени, образуя с ней комплементарный комплекс» (Логашенко, 2006; Martinez et. al., 2004). «Анализ продуктов расщепления мРНК-мишени показывает, что комплекс RISC функционирует как эндонуклеаза, расщепляя фосфодиэфирную связь в составе мРНК с образованием продуктов, характеризующихся наличием концевой 3'-гидроксильной и 5'-фосфатной групп» (Логашенко, 2006; Martinez et. al., 2004). «Связывание с мРНК-мишенью начинается с 5'-конца «ведущей» цепи siРНК. Первый 5'- нуклеотид siРНК оказывается связанным с PIWI доменом белка Ago2, координирующим двухвалентный катион, необходимый для распознавания 5'-концевого фосфата, и не участвует во взаимодействии с мРНК, при этом 3'-гидроксильный конец «ведущей» цепи siРНК находится в комплексе с PAZ доменом белка Ago2» (Логашенко, 2006; Lingel et. al., 2003; Song, 2004).

«5'- и 3'- области "ведущей" цепи siРНК неравноценны в функциональном плане: эффективность связывания комплекса RISC с мРНК зависит от образования комплекса, комплементарного 5'- области «ведущей» цепи siРНК, тогда как скорость и эффективность расщепления зависит от образования дуплекса с 3'-областью» (Логашенко, 2006; Schwarz et. al., 2002).

«Сайтом расщепления мРНК- мишени является фосфодиэфирная связь, соединяющая спаренные 10 и 11 нуклеотиды, относительно 5'-конца цепи siРНК, входящей в состав комплекса RISC» (Логашенко, 2006; Elbashir, 2001). «Расщепленная мРНК-мишень затем деградирует под действием клеточных экзонуклеаз. Процесс расщепления мишени не зависит от наличия АТФ и оставляет антисмысловую цепь siРНК неповрежденной, что позволяет комплексу RISC многократно функционировать» (Логашенко, 2006; Martinez et. al., 2004; Zamore, 2001).

Сайленсинг генов, возникнув в группе клеток, распространяется по растению, вызывая системное ингибирование экспрессии гена-мишени (Voinnet, 2005; Tournier et. al., 2006). «В процессе транспорта сигнала сайленсинга, необходима амплификация этого сигнала в клетках-реципиентах. Она осуществляется при участии РНК-зависимой РНК полимеразы (RdRp) и хеликазы» (Schwach et. al., 2005). «Сигнал сайленсинга генов транспортируется как вверх, так и вниз по растению, но вверх более активно» (Voinnet, 2005). «Однако в клетках крайних зон меристем стебля и корня сайленсинг генов не обнаружен, что свидетельствует об отсутствии транспорта сигнала сайленсинга в эти зоны или не способности этих клеток отвечать на сигнал» (Voinnet, 2005). «Распространение сигнала сайленсинга всегда строго специфично в отношении нуклеотидной последовательности гена-мишени, позволяя, со значительной долей вероятности, предположить, что в роли сигнала сайленсинга выступают короткие интерферирующие РНК» (Dunoyer et. al., 2005).

4.2 Компоненты механизма посттранскрипционного сайленсинга генов

Ключевыми элементами посттранскрипционного сайленсинга генов являются:

- Дайсер (Dicer) и Дайсер-подобные белки (DCL, Dicer-like);
- Малые интерферирующие РНК;
- Белки ARGONAUTE (AGO);
- Эффекторный РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга гена (RISC)
- РНК-зависимая РНК-полимераза (Bagasra, Prilliman, 2004).

4.2.1 DICER-подобные белки

Дайсер (DICER) и его растительные аналоги дайсер-подобные белки (Dicer-Like, DCL) - крупные полидоменные рибонуклеазы из семейства РНКаз III (RNase III), разрезающие двуцепочечную РНК на короткие фрагменты двуцепочечных РНК, которые называют короткими интерферирующими РНК, длиной приблизительно 20-25 нуклеотидов.

Структурно дайсер позвоночных, насекомых и дайсер-подобные белки растений содержат, как правило, шесть типов доменов (рис. 7): DEAD-box, helicase-C, DUF283, PAZ, RNase III, и dsRBD (Margis et. al., 2006).

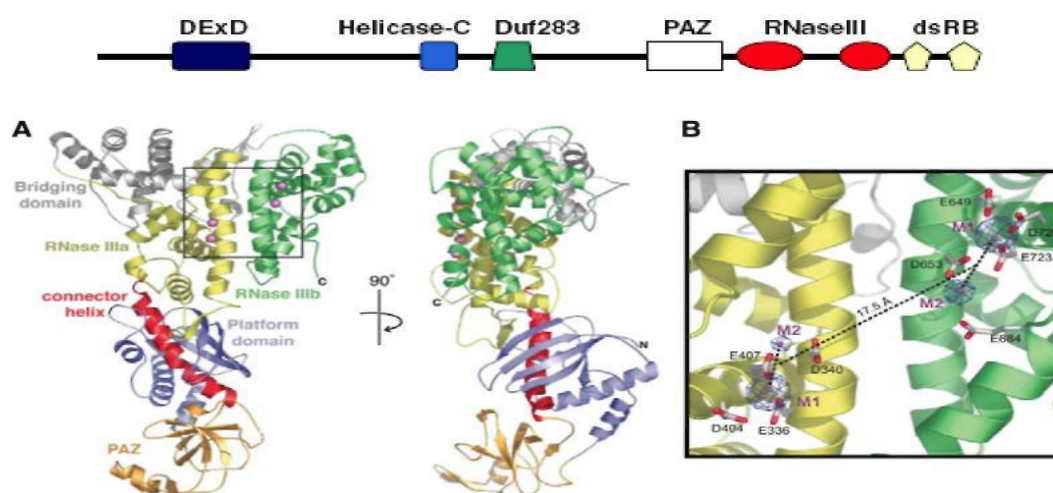


Рис 7: Структура Dicer. В верхней части рисунка представлена линейная проекция доменов найденных в Dicer и Dicer- подобных белках. (A) Пространственное расположение белка Dicer. Синим, отмечена N- область, оранжевым область PAZ, красным соединительная спираль, желтым область RNase IIIa, зеленым RNase III b, серым – Rnase - связывающий домен. (B) Крупный план каталитических центров белка Dicer (Macrae et. al., 2006).

PAZ, RNase III, и dsRBD домены, участвуют в связывании двуцепочечной РНК и ее расщеплении (Macrae et. al., 2006). Область PAZ соединена с RNase IIIа областью длинной α -спиралью и может связывать конец двуцепочечной РНК. Кроме того, домен PAZ также играет роль в связывании одноцепочечных РНК (Kini et. al., 2007). В дополнение к закреплению двуцепочечной РНК, RNase III домен, в дальнейшем непосредственно связывается с PIWI-областью белков Argonaute (Tahbaz, 2004). Домен связывающий двуцепочечную РНК (dsRBD домен) так же участвует в процессе узнавания различных оснований РНК при последующем объединении комплекса (Margis et. al., 2006). Домен DUF283 вовлечен в выбор необходимой короткой интерферирующей РНК, узнавая асимметрию РНК дуплекса или взаимодействуя с dsRBD-доменом (Dlakis, 2006).

У некоторых форм Dicer-подобных белков может отсутствовать, один или несколько доменов (Margis et. al., 2006).

Образование коротких интерферирующих РНК из длинных молекул двуцепочечной РНК посредством белка дайсер осуществляется в цитоплазме (Кленов, 2005; Lee et. al., 2004; Xie et. al., 2004). В результате действия белка дайсер образуются как короткие (25 пар нуклеотидов), так и относительно длинные (130 пар нуклеотидов) молекулы РНК-дуплексов с равной эффективностью. (Логашенко, 2006; Elbashir et. al., 2001).

«Эксперименты *in vitro* продемонстрировали, что белок Дайсер может последовательно отщеплять короткие интерферирующие РНК от молекулы протяженной двуцепочечной мРНК с одного конца» (Логашенко, 2006).

В тоже время показано, что расщепление дайсером протяженной двуцепочечной мРНК может проходить и по внутренним сайтам, но с гораздо меньшей эффективностью (Zhang et. al., 2002).

«При этом если расщепление протяженной двуцепочечной РНК происходит с концевой области, данный процесс предотвращает случайное расщепление протяженных шпильчатых структур, присутствующих во внутренних районах мРНК и других клеточных РНК» (Логашенко, 2006; Morse et. al., 2002).

«Так как Dicer относится к семейству РНКаз III расщепление осуществляется характерным для этого семейства образом - каждый конец дуплекса содержит на 3' конце два выступающих не спаренных нуклеотида, а на 5' конце – фосфат» (Song et. al., 2004). «Рентгеноструктурный анализ белка Dicer из жгутикового простейшего *Giardia* показал, что длина дуплекса коротких интерфирирующих РНК определяется взаимным расположением домена PAZ и каталитических доменов в Dicer». (Кленов, 2005; Macrae et. al., 2006).

«Конец двуцепочечной РНК с двумя 3' выступающими нуклеотидами удерживается PAZ доменом. Двуцепочечная РНК протягивается по поверхности Dicer от PAZ домена к каталитическому центру и это расстояние предопределяет размер новообразованного дуплекса» (Tahbaz et. al., 2004).

«Расположение сайта расщепления белком дайсер определяется именно структурой концов дуплекса, при этом последовательность коротких интерфирирующих РНК, является вторым по значимости фактором» (Логашенко, 2006; Tahbaz et. al., 2004).

Белок дайсер присутствует у всех эукариотических организмов за исключением пекарских дрожжей (Bernstein et. al., 2001). У хордовых животных, и нематод дайсер представлен только одним типом белка, тогда как у высших растений, и некоторых грибов, в частности *Neurospora crassa* и *Magnaporthe oryzae*, присутствуют несколько форм дайсер-подобных белков.

Например, для риса посевного (*Oryza sativa*) характерны 5 форм дайсер-подобных белков. Для абрикоса японского (*Prunus mume*) как и для *A. thaliana* характерны 4 формы дайсер-подобных белков.

Напротив, в организме зеленых морских водорослей, *Chlamydomonas reinhardtii*, присутствует один дайсер-подобный белок с единичными helicase-C, Duf283 и dsRB областями, и двумя областями RNaseIII, что позволило предположить существование единственного общего гена-предшественника, присутствовавшего в общем предке морских водорослей, из которого впоследствии эволюционно развились гены, кодирующие четыре формы дайсер-подобных белков в растениях. Исследуя геном *Tetrahymena thermophila*, общий предок которого разошелся с остальными растениями около 2 миллиарда лет назад нашли, два гена кодирующих дайсер-подобные белки, обладающие helicase-C и двумя RNaseIII областями.

Таким образом, вероятно, именно гены предка *Tetrahymena thermophila* и были основой для формирования современных Dicer-подобных белков в ходе эволюции. Эволюционное расхождение генов кодирующих дайсер и дайсер-подобные белки дайсер в насекомых, нематодов и растениях от последовательности единого предшественника, вероятно, произошло около 1.6 миллиарда лет назад.

Появление пятого Dicer-подобного белка, по времени совпадает с началом эволюционного расхождения геномов хлебных злаков, приблизительно 70 миллионов лет назад (Margis et. al., 2006). Быстрое увеличение семейства дайсер-подобных белков в растениях могло бы быть частично вызвано требованием противодействия вирусным инфекциям (Deleris et. al., 2006). Эволюция вирусов и механизмов их противодействия иммунитету растения-хозяина постоянно продолжается, поэтому разумно предположить, что эволюционное расширение форм семейств дайсер-подобных белков и их видовая гетерогенность также продолжается.

Функции, осуществляемые разными формами дайсер-подобных белков, различаются и, как правило, дайсер-подобные белки являются функционально специализированными.

«Так, в геноме *A. thaliana* базовый набор из четырех паралогов кодирует белки AtDCL 1-4, функционально специализированные и характеризующиеся выраженной избирательностью в отношении субстрата (Xie et. al., 2004; Mlotshwa et. al., 2008). AtDCL1 генерирует микро-РНК, используя в качестве субстрата одноцепочечные РНК, отдельные участки которых обладают несовершенной двуцепочечной структурой типа stem-loop; AtDCL2, AtDCL3 и AtDCL4 обладают большим сродством по отношению к молекулам РНК с совершенной двуцепочечной структурой» (Архипов, 2011).

«При вирусной инфекции все четыре типа DCL-белков арабидопсиса участвуют в расщеплении репликативных форм вирусных РНК, однако основную антивирусную функцию выполняет AtDCL4: в результате действия этого белка образуются вирусспецифические короткие интерферирующие РНК длиной 21 пар нуклеотидов, которые, во-первых, принимают активное участие в процессе специфической деградации вирусной РНК эффекторным комплексом RISC и, во-вторых, функционируют в качестве мобильного сигнала РНК - интерференции (Dunoyer et. al., 2010)» (Архипов, 2011).

«Малые интерферирующие РНК, генерируемые AtDCL2, играют в этих процессах подчиненную роль, а AtDCL1 и AtDCL3, хотя и способны разрезать вирусные двуцепочечные РНК на короткие (24 bp) фрагменты, антивирусной активностью не обладают» (Архипов, 2011).

К сожалению, полностью описать участие дайсер-подобных белков в молекулярных процессах не представляется возможным в контексте данной работы. «По мимо основной функции – продуцента коротких интерферирующих РНК в клетке как компонента антивирусного фитоиммунитета, представляется важным указать на тот факт, что белки семейства Dicer, участвуют и в формировании зрелых микроРНК из шпилечных предшественников» (Кленов, 2005).

«Участие в метаболизме микроРНК и коротких интерферирующих РНК различных дайсер-подобных белков позволяет избежать конкуренции, которая могла бы, например, при вирусном заражении и появлении избытка коротких интерферирующих РНК привести к нарушению важной для клетки микроРНК-зависимой регуляции экспрессии генов» (Deleris et. al., 2006; Margis et. al., 2006).

В других случаях, дайсер и дайсер-подобные белки участвуют в инициации сборки эффекторного комплекса, а также, при участии dsRBD-домена в выборе, какая из цепей короткого интерферирующего РНК-дуплекса будет входить в состав комплекса RISC. (Кленов, 2005; Forstemann et. al., 2007). Таким образом, Dicer не только расщепляет двуцепочечные РНК, но и является компонентом промежуточных белковых комплексов (Tomari et. al., 2007).

4.2.2 Малые интерферирующие РНК

Значительным достижением последних лет в области молекулярной биологии стало открытие целого ряда малых РНК, участвующих в разнообразных биологических процессах. Среди них выделяют, микроРНК (microRNA, miRNA) и малые интерферирующие РНК (small или short interfering RNA, siRNA). Малые интерферирующие РНК включают: piwi-взаимодействующие РНК (piwi-interacting RNA, piRNA), трансдействующие малые интерферирующие РНК (Trans-acting siRNA, ta-siRNA), натуральные антисенскрипт-производные малые интерферирующие РНК (natural antisense transcript-derived small interfering RNA, nat-siRNA), ассоциированные с геномными повторами малые интерферирующие РНК (repeat-associated small interfering RNA, ra-siRNA), гетерохроматиновые малые интерферирующие РНК (heterochromatic small interfering RNA, hc-siRNA) (Rana, 2007).

В контексте данной работы мы остановимся только на классе малых интерферирующих РНК участвующих в обеспечении антивирусного фитоиммунитета.

Малые интерферирующие РНК – двуцепочечные РНК-дуплексы, длиной 19 - 23 нуклеотидных пар, с фосфорилированным нуклеотидом на 5' конце и не фосфорилированными, выступающими двумя нуклеотидами на 3' конце, образующиеся в клетке в результате действия белка дайсер и способные комплементарно (или частично комплементарно) связываться с матричной РНК, направляя действие РНК индуцированного комплекса сайленсинга генов (RISC), что вызывает разрушение этой мРНК и/или ингибирование трансляции. Оба эти эффекта приводят к подавлению экспрессии гена-мишени. (Xie et. al., 2004; Ambros et. al., 2003; Bernstein et. al., 2001; Toman et. al., 2004).

«Следующие структурные критерии, характеризуют наиболее эффективные малые интерферирующие РНК (уровень подавления экспрессии целевого гена > 95%)» (Логашенко, 2006):

- «1) GC состав 30 - 52%;
- 2) не менее трех A/U нуклеотидов в позициях 15-19 смысловой цепи;
- 3) отсутствие палиндромов или инвертированных повторов;
- 4) аденозин в позициях 3 и 19 смысловой цепи;
- 5) уридин в позиции 10 смысловой цепи;
- 6) любой нуклеотид кроме гуанозина в позиции 13 смысловой цепи».
- «7) наличие уридина в позиции 2 и 11 антисмысловой цепи,
- 8) наличие гуанидина в позиции 21 антисмысловой цепи» (Логашенко, 2006; Reynolds et. al., 2004; Amarzguioui et. al., 2004; Chalk et. al., 2004; Huesken et. al., 2005).

Характерным признаком, отличающим малые интерферирующие РНК от микро-РНК, является структура предшественника, из которого образуются siRNA, а именно длинная двуцепочечная РНК различного (трансгены, вирусы и транспозоны) происхождения (Bartel, 2004; Axtell et. al., 2007).

«Эндогенные малые интерферирующие РНК соответствуют, в основном, последовательностям различных мобильных элементов и гетерохроматиновых повторов» (Кленов, 2005; Aravin et. al., 2003).

Образующие малые интерферирующие РНК-дуплексы рибонуклеиновые цепи диссоциируют, при этом одна из цепей, «ведущая», участвует в дальнейших процессах посттранскрипционного генного сайленсинга. Другая цепь, «пассажирская», разрушается.

«Предположительно, разъединение цепей малых интерферирующих РНК- дуплексов является активным, энергопоглощающим процессом, катализируемым одним или несколькими членами семейства белков DEXD/H, использующих энергию аденозинтрифосфата для разделения последовательностей РНК» (Логашенко, 2006; Schwarz et. al., 2002).

«Расхождение цепей малых интерферирующих РНК происходит под действием хеликазы в присутствии АТФ, после чего одна из цепей связывается с белком Ago2 относящемся к семейству белков Argonaute и происходит сборка комплекса RISC» (Логашенко, 2006; Nykanen et. al., 2001; Bartel, 2004). «Альтернативная модель, касающаяся расхождения цепей малых интерферирующих РНК, подразумевает, что с белком Ago2 связывается непосредственно малый интерферирующий РНК-дуплекс» (Логашенко, 2006). Расщепление «пассажирской» цепи происходит в процессе образования комплекса RISC. PIWI домен Ago2 связывается с одним из концов малого интерферирующего РНК-дуплекса (Ma et. al., 2004). Затем Ago2 расщепляет «пассажирскую» цепь.

После расщепления целевой мРНК, комплексом RISC направляемым ведущей цепью малого интерферирующего РНК-дуплекса, участки данной мРНК становятся матрицей для РНК зависимой РНК полимеразы в процессе синтезе длинного двуцепочечного РНК-фрагмента. «Ведущая» цепь малых интерферирующих РНК в данном процессе играет роль праймера.

С образующимся в результате действия РНК-зависимой РНК-полимеразы фрагментом взаимодействует белок дайсер, индуцируя производство вторичных малых интерферирующих РНК.

Кроме первичных и вторичных малых интерферирующих РНК в обеспечении антивирусного фитоиммунитета косвенно могут участвовать nat-siРНК и ta-siРНК.

В образовании транскриптивных малых интерферирующих РНК принимают участие специфические не кодирующие участки генома - TAS гены, микроРНК и РНК-полимераза II (Chapman and Carrington, 2007). Расщепление TAS РНК на две части направляется микроРНК. 5'-концевая часть TAS3, а у остальных TAS РНК 3'-концевая часть преобразовывается в двуцепочечную форму РНК-зависимой РНК-полимеразой II (например, RDR6).

Образовавшиеся двуцепочечные РНК нарезаются дайсер-подобным белком на фрагменты длиной 21 н. - tasiРНК. Таким образом tasiРНК образуются из длинных двуцепочечных РНК предшественников, как и вторичные малые интерферирующие РНК, однако tasiРНК не полностью комплементарны гену-мишени, что роднит их с микроРНК. Регулируют экспрессию генов, при этом «особенность их действия связана с тем, что они функционально инактивируют не те гены, которыми кодируются (TAS гены), а иные гены, в основном кодирующие регуляторные белки, что может повысить устойчивость растений к абиотическим и биотическим факторам» (Liu et. al., 2008).

Nat-siRNA образующиеся в результате действия дайсер-подобного белка (DCL2) на 760-нуклеотидный двухцепочечный транскрипт, участвуют в постранскрипционной регуляции генов, вовлеченных в противовирусный ответ и защиту от патогенных микроорганизмов (Borsani et. al., 2005).

4.2.3 Белки семейства AGO (Argonaute)

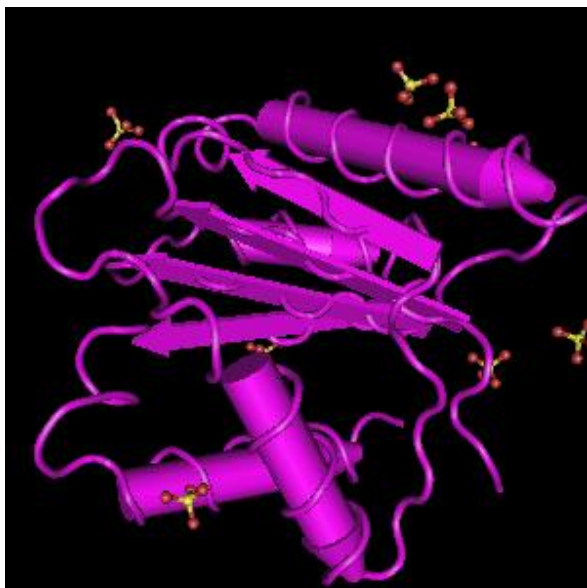
Белки аргонавты (Argonaute, AGO) – семейство белков, участвующих в разнообразных процессах РНК-интерференции, в том числе посттранскрипционном сайленсинге генов. AGO-белки непосредственно взаимодействуют с малыми интерферирующими РНК и являются центральным белковым компонентом комплекса RISC (RNA induced silencing complex), выполняющего расщепление целевой мРНК (Hammond et. al., 2001; Martinez, et. al., 2004).

AGO-белки обнаружены среди эукариот, некоторых архей, грибов и бактерий. Эволюционными предшественниками AGO, по-видимому, являются белки - факторы инициации трансляции (Anantharaman et. al., 2002). У эукариот, AGO-белки в высоких концентрациях обнаруживаются в районах цитоплазмы клеток, известных как цитоплазматические тельца (Ding et. al., 2007).

В растениях AGO представлены несколькими гомологичными белками, в частности у арабидопсиса присутствуют десять (AGO 1-10) белков аргонавтов (Voinnet, 2009).

Аминокислотные последовательности AGO-белков формируют высококонсервативные PAZ и PIWI домены (Hammond et. al., 2001, Caudy et. al., 2003). Такие структурные элементы (Рис 8.) характерны и для AGO экспрессируемых в животных, например AGO кодируемого последовательностью гена rde-1 в *C. elegans* (Tabara et. al. 1999), и растений, argonaute-1 в *Arabidopsis thaliana* (Fagard et. al. 2000), и грибов, qde-2 в *Neurospora crassa* (Catalanotto et. al., 2000).

А



Б

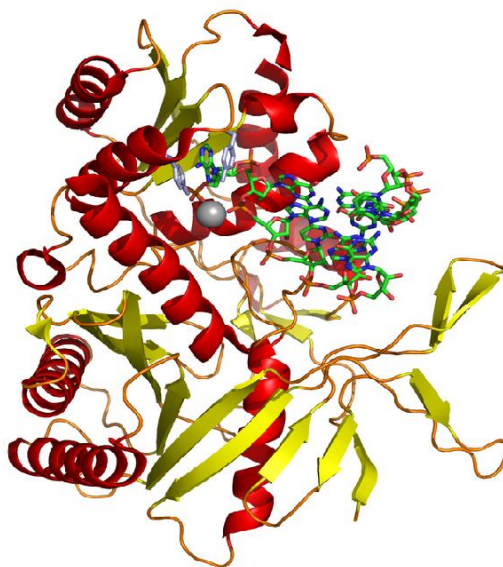


Рисунок 8. Трехмерная модель AGO белков. (А) AGO 2 *Arabidopsis thaliana* взаимодействующий с малыми интерферирующими РНК (Frank, 2012). (Б) Белок Argonaute из археобактерии *Pyrococcus furiosus*. Желтым отмечен PAZ домен, красным - PIWI-домен в комплексе с двуцепочечной РНК (Song et. al., 2004).

«Рентгеноструктурный анализ белка показал, что обладающий эндонуклеазной активностью PIWI домен по структуре схож со структурой РНКазы II, осуществляющей разрезание РНК в РНК-ДНК дуплексах» (Кленов, 2005; Song et. al., 2004).

PAZ домен, способен связываться с 3'-концом малых интерферирующих РНК, обеспечивая ее включение в комплекс RISC (Lingel et. al., 2003). Piwi-домен, участвует, посредством своего С-концевого фрагмента, в белок-белковых взаимодействиях с dsRBD-доменом (домен связывания двуцепочечной РНК) белка дайсер и способен взаимодействовать с 5'-концом малых интерферирующих РНК (Tahbaz et. al., 2004, Ma et. al., 2004).

Мутации в генах, кодирующих AGO-белки, нарушают процесс посстранскрипционного генного сайленсинга (Bartel, 2004), или ингибирование транскрипции в ядре (Zilberman et. al., 2003).

Функциональная роль AGO-белков в клетке разниться в зависимости от того какой из гомологов участвует в молекулярном процессе.

Так у арабидопсиса AGO 1 являясь компонентом RISC взаимодействует с микроРНК (Vaucheret et. al., 2004) и может участвовать также в сайленсинге генов, опосредованном малыми интерферирующими РНК (Bohmert et. al., 1998; Fagard et. al., 2000; Kidner, Martienssen, 2004; Vaucheret et. al., 2004).

«AGO 2 участвует в процессе посттранскрипционного генного сайленсинга, являясь ключевым компонентом РНК-индуцированного комплекса сайленсинга генов и непосредственно расщепляя целевую матричную РНК-мишень» (Архипов, 2011).

«AGO 1,2,3 и 4 (AGO 1-4) совместно с малыми интерферирующими РНК, содействуют модификации хроматина» (Архипов, 2011; Zilberman et. al., 2003; Chan et. al., 2004).

Белки этого семейства участвуют также в развитии меристем у арабидопсиса (Jeffery and Nakielnny, 2004; Kim et. al., 2006; Weinberg et. al., 2006). Кроме того, для отдельных AGO-белков, например AGO 7 *A. thaliana*, характерна тканеспецифичная экспрессия или экспрессия на определенных стадиях развития (Hunter et. al., 2003).

4.2.4 РНК-зависимая РНК полимераза (RdRP)

РНК-зависимая РНК-полимераза (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP) – фермент участвующий в посттранскрипционном геном сайленсинге.

После обнаружения активности RdRP, в 1998 последовательность, соответствующая гену кодирующему РНК-зависимую РНК-полимеразу была выделена из генома томата и клонирована (Schiebel et. al., 1998). Кроме растений, RdRP обнаружены в нематодах, грибах и вирусах, но, по-видимому, не присутствуют у насекомых и позвоночных животных (Cogoni, Macino, 1999; Djupedal, Ekwall, 2009). «При этом в растениях функционируют несколько гомологичных генов кодирующих РНК-зависимые РНК-полимеразы, в частности *Arabidopsis thaliana* и *Solanum lycopersicum* насчитывают шесть функционально активных гена RdRp (Wassenegger, Krczal, 2006), рис и кукуруза пять (Bai et. al., 2012; Kapoor et. al., 2008) и, по крайней мере, три *Nicotiana tabaccum* и *N. attenuate* (Qian et. al., 2011)» (Архипов, 2011).

Белки кодируемые RdRp–генами реализуют различные функции в зависимости от аспекта клеточной деятельности (Wassenegger, Krczal, 2006).

«AtRDR1 у *A. thaliana* и его ортолог в табаке, NtRDR1, участвует в производстве и накоплении малых интерферирующих РНК в зараженных растениях, биосинтезе салициловой кислоты и в случае вирусной инфекции вызванной тобамовирусами повышает восприимчивость к вирусу табачной мозаике (TMV), и вирусу погремковости табака (TRV)» (Diaz-Pendon et. al., 2007; Qu et. al., 2008; Yu et. al., 2003).

RDR1 также участвует в процессах адаптации растений после повреждения травоядными животными (Pandey et. al., 2007). AtRDR2 связана с производством гетерохроматиновых малых интерферирующих РНК, участвует в, опосредованном малыми РНК, процессе метилирования ДНК и модификации гистонов в теломерах у арабидопсиса (Vrbsky et. al., 2010).

Функции AtRDR3–AtRDR5 в настоящее время неизвестны (Willmann et. al., 2011). AtRDR6, участвует в посттранскрипционном сайленсинге генов и биогенезе ta-siRNA (Luo, Chen, 2007).

«В процессе посттранскрипционного сайленсинга генов (PTGS), используя в качестве затравки одну из цепей первичных малых интерферирующих РНК-дуплексов, а в качестве матрицы - молекулу мРНК, этот фермент синтезирует новые, сравнительно протяженные двуцепочечные РНК, используемые белком дайсер для производства вторичных малых интерферирующих РНК» (Архипов, 2011).

У *A. thaliana* (рис. 9) на первой стадии PTGS один или более дайсер-подобных белков расщепляет двуцепочечную мРНК-мишень, образующуюся в результате репликации вирусов. «Первичные малые интерферирующие РНК, образующиеся в результате данного процесса, связываются с AGO белком (AGO 2), и направляют расщепление целевой РНК, участки которой являются матрицей для РНК-зависимой РНК-полимеразы (RDR6)» (Архипов, 2017).

У растений в качестве затравки для начала синтеза могут выступать как отдельные сенс- так и антисенс цепи РНК дуплексов, тогда как у *C. elegans* используется только одна из цепей (Vaistij et. al., 2002).

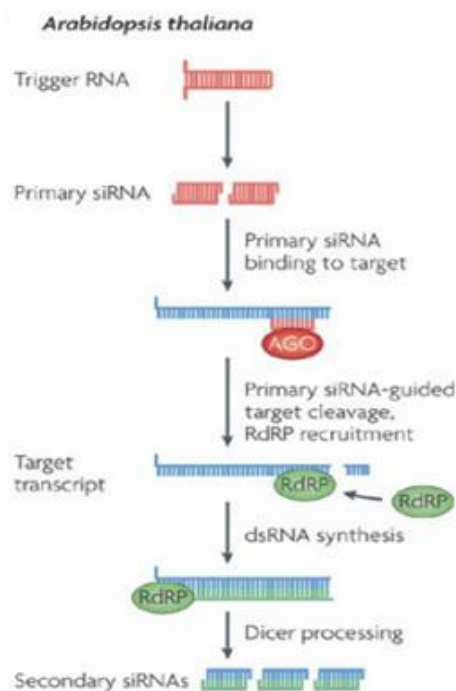


Рисунок 9. Схема участия РНК-зависимой РНК-полимеразы в процессе РНК-интерференции в *A. thaliana* (Chapman and Carrington, 2007).

Синтез образующегося двуцепочечного РНК-фрагмента протекает в строго определенном направлении от 5'- к 3'-концу, а продукт реакции удлинения подвергается расщеплению белком дайсер с образованием вторичных молекул малых интерферирующих РНК (Wassenegger, Krczal, 2006).

«Образующиеся вторичные малые интерферирующие РНК включаются в эффекторный комплекс RISC посредством связывания с ключевым компонентом этого комплекса, белком семейства Argonaute (Ago), что приводит к расщеплению вирусной мРНК» (Elbashir et. al., 2001).

Кроме того, они усиливают эффект интерференции увеличивая его длительность (Sijen et. al., 2001). «У нематод (*C. elegans*), растений (*Arabidopsis thaliana*), и грибов (*Neurospora crassa*) интерферирующее действие малых двуцепочечных РНК-дуплексов распространяется между тканями целого организма, и таким образом подавление экспрессии гена может происходить в любой ткани независимо от того, в какой ткани исходно возникла двуцепочечная РНК» (Кленов, 2005; Winston et. al., 2002; Hunter et. al., 2003). «Данный эффект объясняется активным участием содержащейся в этих организмах РНК-зависимой РНК-полимеразы, способствующей, совместно с другими компонентами РНК-интерференции, образованию вторичных малых интерферирующих РНК, являющихся сигналом сайленсинга» (Архипов, 2017; Dunoyer et. al., 2005).

4.2.5 Эффекторный комплекс

«Можно выделить 3 основных разновидности эффекторных комплексов, содержащих малые РНК:

- Комплекс РНК-индуцированного сайленсинга генов, осуществляющий разрезание РНК-мишени, которой может быть как мРНК, так и любая другая одноцепочечная РНК;
- Микрорибонуклеопротеидный комплекс, направляющий подавление трансляции мРНК и содержащий в своем составе микроРНК;
- Комплекс RITS, осуществляющий подавление транскрипции и репрессию хроматина.

Микрорибонуклеопротеидный комплексы и комплекс РНК-индуцированного сайленсинга генов функционируют в цитоплазме, а комплекс RITS в ядре» (Martinez et.al., 2004).

В контексте данной работы ниже будет рассмотрен эффекторный комплекс задействуемый организмом при поражении вирусной инфекцией.

Эффекторный комплекс РНК-индуцированного сайленсинга генов (RNA-induced silencing complex, RISC) – рибонуклеопротеидный комплекс, расщепляющий, или предотвращающий трансляцию вирусной мРНК-мишени.

«Многочисленные данные свидетельствуют о том, что размер комплексов RISC, значительно варьирует, в частности масса всего комплекса RISC выделенного из культуры клеток *Drosophila melanogaster* была оценена приблизительно в 500 кДа» (Hammond et. al., 2000). В тоже время другая группа установила, что минимальный активный комплекс RITS *Drosophila melanogaster* может иметь массу 232 кДа, в то время как размер центрального компонента - белка AGO-2 - составляет только 130 кДа (Nykanen et. al., 2001).

Центральным компонентом комплекса RISC помимо белков семейства Argonaute (AGO) является и одна из цепей малых интерферирующих РНК-дуплексов, при этом предпочтение отдается тому фрагменту, 5'-конец которого конъюгирован менее прочно.

Комплекс RISC способен также включать в свой состав РНК-дуплексы, не разделенные на отдельные цепи, но в этом случае он остается нефункциональным и неспособен осуществлять дальнейшую деградацию мРНК (Nykanen et. al., 2001).

«Функциональный RISC образует комплекс с вирусной РНК-мишенью, по принципу комплементарности ее последовательности с последовательностью одной из цепей малых интерферирующих РНК включенной в RISC» (Martinez et.al., 2004). «Взаимодействие комплекса РНК-индуцированного сайленсинга генов с вирусной мРНК-мишенью приводит либо к репрессии ее трансляции в случае неполной комплементарности, либо к расщеплению её последовательности приблизительно в середине участка спаривания в случае полной или почти полной комплементарности» (Martinez et.al., 2004).

Нуклеазная активность внутри комплекса RISC опосредована РНКазой II-подобным piwi доменом AGO белка (Martinez et.al., 2004). «Образуются два продукта разрыва. У них отсутствуют защитные структуры (в одном – 3'-концевой polyA-хвост, в другом – 5'-концевой кэп), поэтому эти продукты быстро расщепляются клеточными нуклеазами до отдельных нуклеотидов. RISC освобождается и может участвовать в повторении процесса. Так как реакция RISC – каталитическая и повторяется несколько раз, это обеспечивает очень эффективное и длительное ингибирование экспрессии определённого белка» (Zamore, 2001).

«Функционирование комплекса РНК-индуцированного сайленсинга генов не ограничивается его участием в расщеплении вирусной РНК, эффекторный комплекс участвует в механизме РНК-зависимого метилирования ДНК у растений, репрессии транспозонов, регуляции некоторых хроматиновых генов и ингибировании экспрессии трансгенных конструкций вводимых в геном растения» (Matzke et.al., 2001; Voinnet et. al., 2000; Chan et. al., 2004; Aufsatz et. al., 2004).

5. Вирусные супрессоры РНК-интерференции

5.1. Идентификация вирусных супрессоров РНК-интерференции

«Наиболее эффективной стратегией, выработанной фитопатогенными вирусами в ходе эволюции и позволяющей им преодолевать действие РНК-интерференции, является блокирование генетического сайленсинга посредством специальных белков – супрессоров РНК интерференции» (Scholthof et. al., 2005).

«Вирусные супрессоры РНК-интерференции – специфические белки экспрессируемые вирусом и обладающие помимо иных свойств эффективной способностью противостоять защитной системе, или вовсе подавлять фитоиммунитет растения-хозяина в ходе инфекции» (Scholthof et. al., 2005).

«Многие вирусные белки, известные в настоящее время как супрессоры, изначально были определены как факторы патогенности или вирулентности, так как их экспрессия во многом определяет образование и характер симптомов вирусного заболевания» (Brigneti et. al., 1998).

Как следствие в литературе представлен широкий спектр методов, используемых как для первоначальной идентификации белка как супрессора посттранскрипционного сайленсинга генов, так и дальнейшего установления механизма супрессорной активности подтверждающих первоначальный вывод.

Наиболее часто для установления супрессорной активности исследуемого белка используются методы, предполагающие участие трансгенных растений экспрессирующих те или иные генетические конструкции. «Например, при использовании трансгенных растений, экспрессирующих 5'-концевой сегмент генома вируса гравировки табака (*Tobacco etch virus*, TEV), содержащий последовательность HC-Pro происходило усиление симптомов заболевания при заражении другими вирусами, что являлось первым доказательством того, что HC-Pro участвует в супрессии РНК интерференции» (Vance et. al., 1995).

«Экспрессия данного белка на модели *A. thaliana* привела к дефектам в процессах роста и дифференцировки растений, что вероятно связано с ингибированием микроРНК-ассоциированного гидролиза мРНК транскрипционных факторов» (Lakatos et. al., 2006).

«Эксперименты с трансгенными растениями *N. benthamiana*, экспрессирующими зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP) позволили установить супрессорную активность белка Р19 вирусов семейства *Tombusviridae*. Данные растения, инфицировали картофельным вирусом Х (*Potato virus X*, PVX), выбранным в качестве вектора для экспрессии Р19» (Voinnet et. al., 1999). Сходным образом, при инокуляции вирусом трансгенных растений экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок, установлена способность 16 кДа белка вируса погрешковости табака (*Tobacco rattle virus*, TRV), члена семейства Тобравировусов, супрессировать РНК интерференцию (Voinnet et. al., 1999).

Эксперименты с агроинфильтрацией вирусной последовательности, кодирующей белок Р0, принадлежащий вирусу западной желтухи свеклы (*Beet western yellows virus*, BWYV) в листья трансгенных растений *N. benthamiana* продуцирующих GFP позволили установить супрессорную активность данного белка (Pfeffer et. al., 2002).

Так же распространен метод, в котором анализируется экспрессия исследуемого белка и какого-либо известного мутантного, нефункционального белка-супрессора. Так, участие белка оболочки вируса морщинистости репы (*Turnip crinkle virus*, TCV(CP/p38)) в супрессии РНК-интерференции установлено в экспериментах с агробактериальной инфильтрацией конструкций TCV CP и дефектного Р19 - мутанта вируса кустистой карликовости томатов (Qu et. al., 2002).

Участие белка γb вируса полосатой мозаики ячменя (*Barley stripe mosaic virus*, BSMV) в супрессии РНК интерференции было также отмечено в экспериментах с использованием мутантного вируса погремковости табака, не экспрессирующего свой белок супрессор p16. Отсутствие белка p16 компенсировалось супрессорной активностью, возникающей при экспрессии γb BSMV (Yelina et. al., 2002).

Внесение мутаций позволяет установить и структурные элементы необходимые для осуществления функции супрессии РНК интерференции, как это было продемонстрировано в экспериментах с внесением мутаций в последовательность HC-Pro. «Как оказалось, центральный регион HC-Pro необходим для супрессорной деятельности белка, в то время как его N-концевая часть не является обязательной для данной функции» (Kasschau et. al., 1998).

5.2. Механизм действия вирусных супрессоров РНК-интерференции

«Описания биохимических механизмов работы вирусных супрессоров появились в литературе относительно недавно и накопление информации еще продолжается. Последние молекулярные, биохимические и структурные исследования различных вирусных супрессоров позволили детально рассмотреть механизмы супрессии РНК интерференции у ряда вирусов» (Омаров, Берсимбай, 2010).

«Общим свойством всех вирусных супрессоров является их способность к противодействию защитной системе РНК интерференции на ее различных этапах. Данное противодействие является ярким примером сложной и интенсивной «эволюционной борьбы» между вирусами и растениями» (Омаров, Берсимбай, 2010; Scholthof, 2005).

Potyvirus HC-Pro. «Биохимические исследования HC-Pro показали, что его способность формировать димеры и мультимеры является критической для функции в качестве супрессора РНК интерференции (Plisson et. al., 2003). Кроме того, супрессорная функция HC-Pro может быть также связана с понижением стабильности малых интерферирующих РНК, так как трансгенная экспрессия белка приводит к существенно уменьшенной 5'-концевой модификации вирусных 21 нт малых интерферирующих РНК. (Омаров, Берсимбай, 2010; Ebhardt et. al., 2005). Более того, было обнаружено, что HC-Pro препятствует функциональному метилированию коротких интерферирующих и микроРНК (Омаров, Берсимбай, 2010; Yu et. al., 2005), и связыванию двуцепочечных коротких интерферирующих РНК (Lakatos et. al., 2006). Недавние исследования выявили функциональную роль участка FRNK в структуре HC-Pro белка для связывания коротких интерферирующих РНК и показали, что данная функция взаимосвязана с селективным связыванием микроРНК и степенью амплитуды симптомов вирусного заболевания» (Омаров, Берсимбай, 2010; Shibolet et. al., 2007).

Tombusvirus P19. «Функция P19 в качестве вирусного супрессора состоит в том, что в ходе инфекции белок P19 связывает обильно циркулирующие вирусные короткие интерферирующие РНК, делая их недоступными для программирования RISC, активность которого направлена на разрушение вирусной РНК. В результате этого происходит аккумуляция вирусных молекул РНК в инфицированном организме. Доказательством в поддержку данной модели служит тот факт, что инфекция *N. benthamiana* с дефектными по P19 мутантами TBSV ассоциирована с присутствием в растениях RISC комплекса, который содержит вирусные короткие интерферирующие РНК и имеет специфичную рибонуклеазную активность» (Омаров, Берсимбай, 2010; Pantaleo et. al., 2007).

«Также было показано, что P19 препятствует процессу защитного метилирования микроРНК» (Омаров, Берсимбай, Yu et. al., 2005).

«Таким образом, есть основание предполагать, что способность Р19 связывать короткие интерфирующие РНК может препятствовать работе фермента HEN1, ответственного за метилирование коротких интерфирующих РНК (это было показано для некоторых других вирусных супрессоров)» (Омаров, Берсимбай, 2010).

Cucumovirus 2b. «Последние исследования показали, что экспрессия 2b существенно уменьшает накопление 21, 22 и 24 нт типов коротких интерфирующих РНК, генерация которых катализируется ферментами DCL4, DCL2, и DCL3 соответственно (Diaz-Pendon et. al., 2007). Более того, отсутствие инфективности у 2b-дефектного вируса компенсируется в растениях с двойными мутациями dcl2 и dcl4, дефектными в синтезе 21 и 22 нт коротких интерфирующих РНК» (Омаров, Берсимбай, 2010; Diaz-Pendon et. al., 2007).

«Супрессия РНК интерференции белком 2b также ассоциирована со связыванием молекул коротких интерфирующих РНК. Показано, что белок 2b мутантного варианта CMV (имеющего замену одной аминокислоты в 2b и слабое инфицирование растений) был в значительной степени дефектен и в способности связывания коротких интерфирующих РНК» (Омаров, Берсимбай, 2010; Goto et. al., 2007). «Это может свидетельствовать о том, что способность вирусного супрессора "крепко связывать" короткие интерфирующие РНК является важным фактором патогенности вируса» (Омаров, Берсимбай).

«Недавние исследования показали, что в отличие от большинства известных вирусных супрессоров, 2b непосредственно взаимодействует *in vitro* и *in vivo* с AGO1, который является каталитическим центром RISC комплекса» (Омаров, Берсимбай, 2010; Zhang et. al., 2002).

«Более того, обнаружено, что взаимодействие между 2b и AGO1 ведет к специфическому ингибированию ферментативного гидролиза РНК-нуклеазным комплексом» (Омаров, Берсимбай, 2010).

«Способность 2b непосредственно взаимодействовать с RISC для снижения его активности является наглядным примером сложности совместной эволюции и адаптации растений и вирусов» (Омаров, Берсимбай, 2010).

Polerovirus P0. «Экспрессия P0 вызывает деградацию AGO1 белка в растении (Bortolamiol et. al., 2007). Параллельные биохимические исследования по механизму P0 супрессии РНК интерференции показали, что F-box белок взаимодействует с PAZ доменом в AGO1. F-box белки являются компонентами комплексов E3 убиквитин лигазы, которые маркируют белок для протеасомной деградации (Baumberger et. al., 2007) и, возможно, упомянутое выше взаимодействие с SKP1 является функционально важным. Примечательно, что данное взаимодействие завершается протеолитической деградацией AGO1. Однако остается неясным, что конкретно приводит к деградации AGO1, так как данный процесс не чувствителен к специфичному ингибитору протеасомной активности» (Омаров, Берсимбай, 2010; Baumberger et. al., 2007).

«Таким образом, способность P0 вызывать AGO1 деградацию, является дополнительным примером всей сложности процесса вирусной адаптации к защитному механизму РНК интерференции» (Омаров, Берсимбай, 2010).

Tobamovirus репликаза. «Биохимические эксперименты по изучению взаимодействия TMV репликазы с молекулами РНК указывают, что данный белок имеет способность связывать молекулы коротких интерферирующих РНК. (Омаров, Берсимбай, 2010; Kurihara et.al., 2006). Подобно TMV, другой репликазный белок 122 кДа штамма вируса (cr-TMV), инфицирующего растения семейства крестоцветные, также способен связать 21 нт короткие интерферирующие РНК и спаренные микроРНК, таким образом предотвращая их встраивание в RISC (Csorba et. al., 2007). Более того было показано, что способность белка связывать короткие интерферирующие РНК

не препятствует активности уже препрограммированного RISC, указывая на необратимость механизма программирования нуклеазного комплекса. (Омаров, Берсимбай, 2010; Csorba et. al., 2007).

Последние исследования указывают на то, что инфекция TMV препятствует метилированию коротких интерфирирующих РНК, ферментом HEN1 метилтрансферазой. (Омаров, Берсимбай, 2010; Vogler et. al., 2007).

К тому же, данный эффект и формирование симптомов заболевания были непосредственно связаны с экспрессией репликазного белка 126 кДа (Vogler et. al., 2007). Однако остается неясным, влияет ли данный супрессор непосредственно на активность HEN1, или же он участвует в процессе деметилирования уже преметилированных молекул коротких интерфирирующих РНК. Интересным и в определенной мере противоречивым является факт, что экспрессия репликазного белка 122 кДа *cr*-TMV сопряжена с увеличенной аккумуляцией молекул коротких интерфирирующих РНК, несмотря на его негативное влияние на HEN1 метилтрансферазу, активность которой необходима для поддержания стабильности молекул этих РНК» (Омаров, Берсимбай, 2010; Csorba et. al., 2007).

Closterovirus P21. «Структурные исследования выявили взаимодействие альфа-спиральных мономеров белка P21, в которых N- и C-концевые участки белка соприкасаются с соседними мономерами посредством симметрических head-to-head, tail-to-tail взаимодействий. (Омаров, Берсимбай, 2010; Ye et. al., 2003). Белок формирует октамерические кольца с центральной впадиной диаметром $\sim 90 \text{ \AA}$ и позитивно-заряженной внутренней поверхностью кольца, которая, вероятно, играет роль в связывании молекул коротких интерфирирующих РНК (Омаров, Берсимбай, 2010). Более того было показано, что в противоположность селективному взаимодействию Tombusvirus P19 с молекулами коротких интерфирирующих РНК длиной 21 нт, BYV P21 образует связывающую поверхность,

отвечающую за электростатическое взаимодействие с короткими интерфирирующими РНК 21 нт, а также более длинными одно- и двуцепочечными РНК *in vitro*. (Омаров, Берсимбай, 2010). Вероятно, способность Р21 связывать длинные двуцепочечные РНК вовлекает дополнительную супрессивную деятельность белка, возможно на уровне синтеза молекул коротких интерфирирующих РНК» (Омаров, 2010).

«Резюмируя, Р21 представляет собой вирусный супрессор РНК интерференции, который подобно ранее обсуждаемым примерам, препятствует программированию RISC, необходимого для нуклеазной деградации вирусной РНК» (Омаров, Берсимбай, 2010; Ye et. al., 2003).

Белок оболочки Turnip crinkle virus (TVC). «Исследования показали, что, в отличие от Р19 и HC-Pro, TCV CP связывает двуцепочечные РНК вне зависимости от размера молекул, т.е. белок также связывает длинные двуцепочечные РНК. (Омаров, Берсимбай, 2010; Meraï et. al., 2006). Это означает, что взаимодействие CP: двуцепочечные РНК может препятствовать доступности субстрата для Dicer-подобной нуклеазы, что приводит к уменьшению аккумуляции коротких интерфирирующих РНК». (Омаров, Берсимбай, 2010).

«Действительно, последние исследования установили решающую роль р38 в ингибировании DCL4, который отвечает за продукцию 21 нт вирусных коротких интерфирирующих РНК (Deleris et. al., 2006). Интересно, что р38 не препятствует активности DCL2 фермента, который необходим для синтеза 22 нт коротких интерфирирующих РНК. Более того, результаты данной работы показали, что деятельность супрессора р38 не зависит от вирион-формирующей функции белка» (Омаров, Берсимбай, 2010).

Небольшие цистеин-обогащенные белки. «Цистеин-обогащенные белки, кодируемые вирусами, которые принадлежат семействам *Hordeivirus*, *Tobravirus*, *Pecluvirus*, *Furovirus* и *Carlavirus*, не проявляют существенного родства, однако они обладают структурным сходством и играют важную

роль в вирусных инфекциях, и функционируют в качестве патогенных вирусных факторов» (Омаров, Берсимбай, 2010; Dupoyer et. al., 2010).

Tobravirus 16K. «В процессе инфекции этот белок играет ключевую роль для эффективной аккумуляции TRV. Более того, мутационная инактивация гена 16K компенсировалась созэкспрессией CMV 2b, что указывало на функциональное сходство белков в механизме супрессии РНК интерференции. (Омаров, Берсимбай, 2010). Обнаружено, что белок 16K в состоянии частично супрессировать РНК интерференцию в клетках дрозифилы". (Омаров, Берсимбай, 2010; Ghazala et. al., 2008). Последующие трансформационные эксперименты с использованием агробактерий на GFP-трансгенных растениях *N. benthamiana* показали, что для активности 16K требуется экспрессия полной последовательности белка. (Ghazala et. al., 2008). Экспрессия 16K ведет к незначительному уменьшению уровня аккумуляции GFP коротких интерферирующих РНК, подчеркивая возможную роль белка в супрессии начальных этапов РНК интерференции в инфицированных растениях» (Омаров, Берсимбай, 2010; Ghazala et. al., 2008).

«Последние данные свидетельствуют, что TRV-16K блокирует РНК интерференцию до момента образования двуцепочечных РНК, так как супрессионная активность белка нивелировалась с увеличением количества двуцепочечных РНК» (Омаров, Берсимбай, 2010; Martinez-Priego et. al., 2008).

Hordeivirus γb . «Биохимические анализы показали, что BSMV γb взаимодействует с одноцепочечными РНК посредством трех Zn-связующих участков, находящихся на N-терминальной части белка. (Омаров, 2010; Bragg et. al., 2004). РНК связующая способность γb белка существенно стимулируется в присутствии Zn ионов (Rakitina et. al., 2006). Эти результаты дают основание предполагать, что взаимодействие вирусного белка с РНК является ключевой функцией γb в супрессии РНК интерференции» (Омаров, Берсимбай, 2010).

5.3. Комплементационные взаимодействия между различными вирусными супрессорами РНК-интерференции

Синергистические вирусные заболевания растений характеризуются взаимодействием двух или более независимых вирусов в одном хозяине и ярко выраженными признаками и увеличением накопления одного из вирусов в совместной инфекции. «При этом супрессорная активность одного из вирусов способна оказывать комплементирующее воздействие на иные вирусы входящие в вирусный комплекс тем самым позволяя заражать растения всем конгломератом вирусов. Более того способность белка обладать супрессорной активностью может измениться, даже среди изолятов тех же самых видов вирусов» (Rochow, Ross, 1955).

В качестве примера можно привести такие вирусы как вирус слабого пожелтения жилок свеклы (BMVYV), вирус желтистости репы (turnip yellows virus, TuYV) и вирус хлороза свеклы (beet chlorosis viruses BChV) принадлежащих роду *Polerovirus*.

Все палеровирусы, как и другие члены семейства *Luteoviridae*, локализованы во флоэме и передаются несколькими разновидностями тлей (Stevens et. al., 2005). Геном представлен одноцепочечной РНК положительной полярности, состоящей из шести открытых рамок считывания (ОРС). ОРС 1 и ОРС 2 требуются для репликации вируса. ОРС 3 кодирует белок оболочки (Stevens et. al., 2005). Продуктом ОРС 4, как предполагают (Brault et. al., 1995), является транспортный белок. N-концевая область Р5 содержит элементы используемые для переноса вируса тлями и вирусного накопления в растениях. Хотя область белка-супрессора Р0 вируса желтистости репы схожа с подобной последовательностью у вируса хлороза свеклы и вируса умеренной желтоватости свеклы (*beet mild yellowing virus*, BMVYV), способность подавлять РНК сайленсинг была неоднородной, даже среди тесно связанных членов того же самого вирусного рода (Beuve et. al., 2008).

Так, среди шести BMVYV изолятов, два изолята (BMVYV-N32, и -26) не показали супрессорную активность. Последовательности Р0 этих двух изолятов, являются самыми близкими к BChV в пределах группы BMVYV (Kozłowska-Makulska et. al., 2009).

Р0 шести изолятов BChV, не обнаруживал супрессорную активность РНК сайленсинга, хотя, Р0 очень схожего палеровируса BMVYV является супрессором рнк-интерференции (Kozłowska-Makulska et. al., 2009). В случае вируса хлороза свеклы супрессорной активностью мог обладать иной вирусной белок или же имело место взаимодействие между Р0 и другим вирусным фактором. Например, в результате синергистической инфекции. Подобное показано также для некоторых членов потексвирусов (Voinnet et. al., 1999) и нескольких штаммов вируса огуречной мозаики (Zhang et. al., 2002).

Во множество таких синергистических болезней вовлечены члены потививирусной группы растительных вирусов.

В обусловленном потививирусами синергизме вирус в смешанной группе может относиться к любому виду широкого диапазона вирусов, включая параретровирусы, такие как вирус мозаики цветной капусты или РНК вирусы семейства *Alphavirus*, например, X вирус картофеля [PVX] (Rochow, Ross, 1955) или семейства *Picornavirus*, например вирус мозаики вигны (Anjos et. al., 1992). Несколько таких синергистических болезней, обусловленных наличием потививирусов были исследованы подробно, и в каждом, значительное увеличение признаков болезни наблюдалось на растениях зараженных синергитической группой нежели у растений, зараженных каким-либо отдельным видом вируса (Rochow, Ross, 1955).

Например, экспрессия Р1/НС-про вируса гравировки табака (TEV) «увеличивает патогенность и накопление вируса табачной мозаики (TMV) и вируса огуречной мозаики (CMV), двух разнородных растительных вирусов,

которые вызывают эффект синергизма в случае развития вирусной инфекции в комплексе с потивирусами» (Clark et. al., 1980).

Вероятно, обусловленный наличием потивирусов, эффект синергизма может происходить из-за наличия последовательности P1/HC-Pro. Для проверки этой гипотезы были использованы (Gaill Pruss, et.al., 1997) вирусы табачной (TMV) и огуречной (CMV) мозаики, для заражения трансгенной линии табака U-6В, экспрессирующей P1/HC-Pro область генома вируса гравировки табака.

Репродукция обоих вирусов вызывала явные признаки инфекции в трансгенной линии U-6В, приводящей к смерти растения-хозяина в течение нескольких недель. На контрольных растениях, напротив, наблюдались относительно умеренные признаки болезни при заражении обоими вирусами. Наблюдалось увеличение накопления геномных РНК TMV и CMV, в растениях экспрессирующих последовательность P1/HC-Pro TEV (Gaill Pruss et. al., 1997).

Это подтвердило гипотезу о том, что P1/HC-Pro область вируса гравировки табака действует в качестве усилителя патогенности для широкого диапазона вирусов.

Вероятно, в синергистических инфекциях последовательность P1/HC-Pro действуя на посттранскрипционное подавление активности вирусных генов в растениях позволяет широкому диапазону вирусов обходить защитные системы иммунной системы растения – хозяина.

Логично предположить, что и другие супрессоры могут вызывать подобный эффект.

II МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Получение растительного материала

Луковицы зараженного ХВШ шалота (*Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don, селекционный образец N803) выращивали в вегетационных сосудах, при температуре 21-25°C и относительной влажности 80%, в течение двух-трех недель.

В качестве контрольных (не инфицированных ХВШ) образцов использовали растения шалота сорта "Red Sun" (Crocus Co., UK) и сорта "Княжич" (ООО Агрофирма СеДек, Россия).

В ряде экспериментов, аналогичным образом высевали и выращивали растения арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*).

Затем листья срезали и гомогенизировали с использованием жидкого азота. Объем собранной таким образом растительной массы составлял, для шалота в среднем 75гр и 6гр для арабидопсиса соответственно.

2. Оценка уровня накопления X вируса шалота

«Источником вируса служили растения шалота (*Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don, селекционный образец № 803), размножаемого вегетативным путем в условиях моновиральной инфекции» (Архипов, 2017).

Уровень накопления ХВШ в растениях оценивали по результатам электрофоретического анализа ампликонов, полученных методом обратной транскрипции РНК X вируса шалота и полимеразной цепной реакции к-ДНК X вируса шалота с использованием диагностических праймеров IAV-F 5'-CYG-CTA-AGC-TAT-ATG-CTG-AAR-GG-3' и IAV-R 5'-TGT-TRC-AAR-GTA-AGT-TTA-GYA-ATA-TCA-ACA-3' (Majumder et. al., 2007).

3. Выделение тотальной РНК

«Тотальную РНК экстрагировали из листьев шалота через две недели после высадки луковиц» (Архипов, 2011). «Для экстрагирования использовали 1 мл., реагента тризол (TRIzol Reagent, Life Technologies, США) с последующей инкубацией в течение 5 минут при комнатной температуре» (Архипов, 2011). РНК очищалась от протеинов, липидов и нерастворимых остатков добавлением к супернатанту 350 мкл., хлороформа и, с последующей инкубацией в течение 10 минут и центрифугированием 12 000 об/мин. в течение 5 минут. Смесь разделялась на нижнюю хлороформную фазу, межфазу и верхнюю водную фазу содержащую РНК. К верхней водной фазе, перенесенной в чистую пробирку, добавляли 500 мкл., изопропилового спирта и смесь центрифугировали 5 минут при 12 000 об/мин. Осадок промывали 75% этанолом. Выделенную тотальную РНК растворяли в 30 мкл свободной от нуклеаз воды.

4. Получение вирусного препарата ХВШ

«Вирусный препарат ХВШ получали следующим образом: листья шалота гомогенизировали в 0,1М калий-фосфатном буфере, pH 8,2, содержащем 5 mM ЭДТА и 0,5 % Na_2SO_4 , затем экстракт фильтровали через Miracloth (Calbiochem) и центрифугировали 30 мин при 10000g и температуре 4°C. К полученному супернатанту при перемешивании добавляли Triton X 100 до конечной концентрации 1%. После инкубации в течение 15 часов при +4°C раствор центрифугировали при 15000g 15 мин. Вирус осаждали из полученного супернатанта ультрацентрифугированием в течение 3 часов в роторе SW41 на скорости 40000 оборотов в мин при +12°C через слой раствора сахарозы плот-ностью 1,0 г/см³, приготовленного на 0,01 М калий-фосфатном буфере, pH 7,5 содержащем 5 mM ЭДТА» (Калошин, 1999). Вируссодержащий осадок ресуспендировали в 50 мкл., воды, свободной от нуклеаз.

5. Выделение вирусной РНК ХВШ

«Вирусный препарат смешивали с равным объемом экстрагирующего буфера (200 мМ карбоната аммония, pH 9; 2мМ EDTA; 2% SDS). Депротеинизацию проводили добавлением к раствору протеиназы К, до концентрации 15 мкг/мг и инкубировали 15 минут, при комнатной температуре. Затем проводили экстракцию равным объемом смеси фенол/хлороформ (1:1). РНК преципитировали добавлением 2-5 объемов этанола и ацетата натрия (конечная концентрация 100 мМ)» (Архипов, 2013). Концентрацию вирусной геномной РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoPhotometer™ Pearl (Implen); качество препаратов вирусных РНК оценивали методом электрофореза в 0,8% агарозных гелях (буфер TBE: 0.089M Tris, 0.089M boric acid, 0.002M EDTA, pH 8.0), напряжение электрического поля 5V/cm, и в дальнейшей работе использовали препараты с минимальной степенью деградации РНК.

6. Синтез кДНК

«Синтез кДНК осуществляли следующим образом: на стадии отжига инкубационную смесь, содержащую 0,5-2,0 мкг тотальной РНК, 2 мкл олиго(dT)18 (40 мкМ) или «случайных» (random hexamers, 40 мкМ) праймеров, 4 мкл смеси dNTP (каждый в концентрации 2,5 мМ, pH 7,0, Трис-HCl) и свободную от нуклеаз H₂O (общий объем смеси 16 мкл), прогревали при 70°C в течение 5 мин, центрифугировали и немедленно помещали на лед; к смеси добавляли 2 мкл 10x RT буфера, 1 мкл (10 ед.) ингибитора рибонуклеаз (RNasin) и 1 мкл (50 ед.) ревертазы (M-MLV, Moloney) («Синтол», Россия). Обратную транскрипцию (в объеме 20 мкл) проводили при 42°C в течение 1 часа, и фермент затем инактивировали нагреванием при 90°C в течение 5 мин» (Архипов, 2011).

7. Амплификация индивидуальных фрагментов кДНК

Амплификацию индивидуальных фрагментов вирусной и тотальной кДНК осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в следующих условиях: 1. 94°C 2 мин.; 2. [94°C 30 сек., 60°C 30 сек., 72°C 30 сек., 30 циклов]; 3. финальная элонгация 72°C 2 мин. ПЦР проводили в термоблоке «Терцик» фирмы «ДНК-Технология». Инкубационная смесь объемом 50 мкл., содержала: 5 мкл., 10X Taq buffer, 5 мкл (2 mM) каждого dNTP, 0,5 мкМ каждого праймера, 0,5 мкг ДНК-матрицы, 1 мкл (5ед.) Taq-полимеразы ДНК. Так же использовалась полимераза Encyclo (Evrogen) обладающая 3'-5' экзонуклеазной корректирующей активностью.

8. Амплификация 5'- и 3' - концевых фрагментов геномной РНК

Х вируса шалота

Амплификацию 5' – концевого участка геномной РНК ХВШ, проводили используя FirstChoice RLM-RACE (Ligase-Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends) кит (Ambion). Амплификацию 3' – концевого участка геномной РНК ХВШ, включающего poly-A последовательность, проводили методом 3' – RACE-PCR с помощью набора SMARTer RACE с DNA Amplification Kit (Clontech).

Синтез первой цепи кДНК проводили обратной транскриптазой со слабой РНазной активностью вируса лейкоза мышей Молони, (М-MLV RT Moloney, RNase H activity, syntol). 3.75 мкл (0,1мкг) геномной РНК ХВШ и 1 мкл (224 мкг/мкл) 3-RACE-CDS праймера прогревали при 72°C в течение 3 мин, охлаждали до 42°C в течение 2 минут. Затем в инкубационную смесь (финальный объем - 10 мкл) добавляли 4 мкл Mg-содержащего RT буфера (2 мкл M-MLV RT bufferr (A) 5x), 1 мкл (10mM) смеси dNTP, 1 мкл (20 mM) DTT), 0.25 мкл (40ед.) «RNasin и 1 мкл (50ед.) обратной транскриптазы. Синтез кДНК проводили при 42°C в течение 90 минут.

Амплификацию фрагментов ДНК осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР проводили в следующих условиях: 1. 94°C 2 мин.; 2. [94°C 30 сек., 68°C 30 сек., 72°C 30 сек., 20 циклов]; 3. финальная элогация 72°C 3 мин» (Архипов, 2017).

Инкубационная смесь содержала: 5 мкл 10X Taq buffer, 1 мкл (10 mM) каждого dNTP, 5 мкл смеси UPM-Long и UPM-Short праймера (Таблица 4), 1 мкл CP-GSP2 праймера, 2,5 мкл к-ДНК-матрицы, 1 мкл (5ед) Taq-полимеразы ДНК.

Таблица 4. Структура праймеров, амплифицирующих 5'- и 3'- фрагменты генома Х вируса шалота.

Название	Последовательность
5-RACE-ShRACE-inner	TTG-TCG-GCA-GCA-TGT-GTG-TGT-GAA-GT
5-RACE-ShRACE-outer	GCC-AAT-AAT-TGT-GAG-GCA-GTC-ATT
3-RACE-CDS Primer	AAG-CAG-TGG-TAT-CAA-CGC-AGA-CTA-CTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TVN
UPM-Long	CTA-ATA-CGA-CTC-ACT-ATA-GGG-CAA-GCA-GTG-GTA-TCA-ACG-CAG-AGT
UPM-Short	CTA-ATA-CGA-CTC-ACT-ATA-GGG-C

9. Фракционирование ампликонов

«Амплифицированные фрагменты фракционировали в 0,8% агарозном геле на основе TBE буфера при напряженности эл. поля 120 v. Очистка ампликонов от функциональных элементов смеси ПЦР осуществлялась с применением DNA extraction kit # K0513 («Fermentas», Литва)» (Архипов, 2011).

10. ПЦР в реальном времени

«Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили при следующем термальном цикле: 1. 94°C 2 мин.; 2. [94°C 30 сек., 60°C 30 сек., 72°C 30 сек., 30 циклов]; 3. финальная элонгация 72°C 2 мин., с использованием приборов Light Cycler 96 (Roche, Германия), 7500/7500 Fast Real-Time PCR Systems и QuantStudio («Applied Biosystems», США), и комплекта реагентов, входящих в набор «2,5X Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I» (Синтол, Россия)» (Архипов, 2017). Инкубационная смесь объемом 25 мкл., содержала: 10 мкл., 2,5X реакционной смеси, 1 мкл., (10 пкмоль/мкл) каждого праймера, 1 мкл., (0,5 мкг) ДНК-матрицы, 12 мкл., со свободной от нуклеаз воды.

Образец ДНК в каждом эксперименте был представлен в трехкратной повторности.

«Расчеты относительных уровней экспрессии генов-мишеней (GOI gene of interest) инфицированных (S, sample) и здоровых (C, calibrator) растений шалота осуществляли с использованием алгоритма $\Delta\Delta C_t$:

$$\text{Fold difference} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

$$\Delta C_t \text{ sample} - \Delta C_t \text{ calibrator} = \Delta\Delta C_t$$

$$C_t \text{ GOIS} - C_t \text{ normS} = \Delta C_t \text{ sample}$$

$$C_t \text{ GOIC} - C_t \text{ normC} = \Delta C_t \text{ calibrator.}$$

В качестве калибратора использовали сеянцы шалота, в качестве нормализатора (norm) – ген растительной 18S рибосомальной РНК, уровни экспрессии которого в здоровых и инфицированных образцах шалота были одинаковы» (Архипов, 2017).

11. Определение нуклеотидной последовательности

Нуклеотидную последовательность ампликонов определяли в 16-ти капиллярном автоматическом сиквенаторе «Applied Biosystems 3130xl» с набором химических реактивов «BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit» и концентрацией праймеров 3,2 pM, при следующем термальном режиме: 96°C - 10сек; 50°C - 5сек; 60°C - 4мин., 25циклов.

12. Компьютерный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

Дизайн праймеров осуществляли с помощью программы Primer3 (v.0.4.0), используя информацию, полученную при секвенировании 3' – концевой участка геномной РНК ХВШ и соответствующие данные из GenBank (NCBI).

Выравнивание нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, расчет степени их гомологии и эволюционного сходства с другими организмами, проводили с помощью компьютерных программ пакета BLAST (align, nucleotide blast, protein blast), BioEdit.

Идентичность нуклеотидов в выравниваниях определялось программным обеспечением GeneDoc (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>). Анализ сходства выровненных последовательностей проводился, используя сетевое приложение PLOTCON (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/plotcon>).

Попарные выравнивания последовательностей для вычислений процента идентичности были проведены алгоритмом Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970).

Филогенетический анализ выполнялся, используя пакет программ Mega5 (Tamura et. al., 2011) доступный на <http://megasoftware.net/>.

13. Клонирование генов

Нуклеотидные последовательности, соответствующие той или иной рамке считывания, индивидуально клонировали в бинарный вектор pLN 7000*, несущий гены устойчивости к спектомицину и стрептомицину (Рис 10).

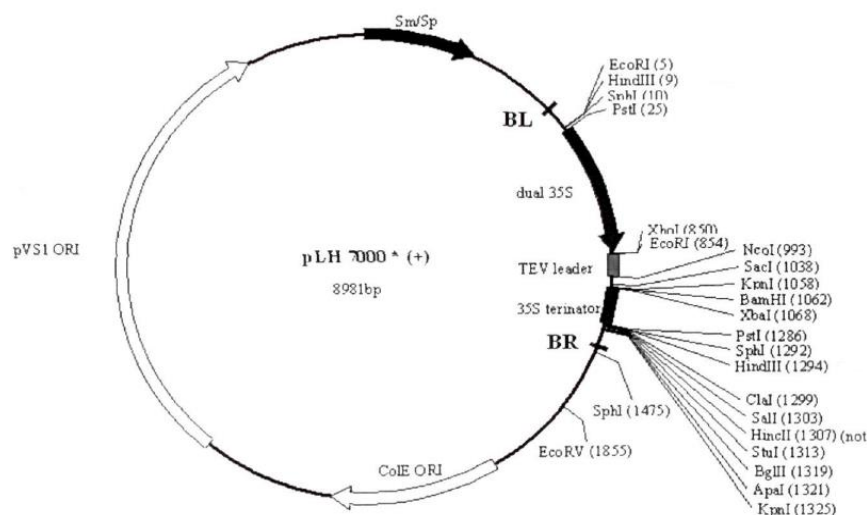


Рисунок 10. Карта бинарного вектора на основе плазмиды pLN 7000*

Очистка вырезанных из геля ампликонов и вектора проводилась с помощью кита # K0513 ((«Fermentas», Литва). Легирование проводили с помощью ДНК-лигазы фага Т4, в течение 2 часов при комнатной температуре в объеме 12 мкл. «Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки тетрациклин-устойчивого штамма *E. coli* XL-Blue (Stratagene Gene Cloning System). После трансформации культуру высевали на чашки с LB-агаром, содержащей 50 мкг/мл спектомицина» (Архипов, 2013; Калошин, 1999).

14. Анализ полноразмерных кДНК копий генов, кодирующих белки X вируса шалота

Первичный анализ клонов проводили с помощью рестриктоного анализа, по сайтам рестрикции Xba I, Nco I, и ПЦР с фланкирующими праймерами. Были отобраны клоны со вставками, соответствующими расчетной длине генов, кодирующих вирусные белки.

Отборанные клоны секвенировались используя пары праймеров Left-60 CTG-ACG-TAA-GGG-ATG-ACG-CAC-AAT и Right-60 CCT-TAT-CTG-GGA-ACT-ACT-CAC-ACA-TT концентрацией 3,2 pM/мкл. Клоны, концевые последовательности которых соответствовали концевым последовательностям геномной РНК, были использованы в дальнейшей работе.

15. Инфильтрация векторов

Векторами, на основе плазмиды pLN, концентрацией 5 мкг, несущими вставку целевых генов, трансформировали штамм агробактерий C58C1 устойчивого к рифампицину. Трансформированную культуру высевали на чашку со средой Lb содержащей антибиотик в концентрации 100 мкг/мл. Колонии выращивали в течение 3 дней при комнатной температуре.

16. Инокулирование интактных растений

Для агроинфильтрации полученные колонии агробактерии штамма C58C1 содержащие плазмиду со вставкой целевого гена размножали инкубированием в 5 мл среды LB содержащей, в финальной концентрации, 100 мкг/мл каждого антибиотика, 0,01 М МЕС и 0,02 мМ Acetosyringone, при 180 об\мин и комнатной температуре в течение 18 часов. Ночную культуру осаждали центрифугированием 3600 об\мин. Затем клетки помещали в буфер для инфильтрации (10 мМ МЕС, 10 мМ MgCl₂, 0,15 мМ Acetosyringone) и перемешивали на 40-70 об\мин 1-1,5 часа.

Перед инокулированием полученный раствор развели инфильтрационным буфером до оптической плотности клеток 1 OD₆₀₀. Инокулирование проводили в листовую поверхность интактных растений *Nicotiana benthamiana*. Уровень экспрессии репортерного гена оценивали по результатам флуорометрии на флуоресцентном спектрометре LS 55, PerkinElmer и методом иммуноблотинга.

17. Электрофорез в полиакриламидных гелях и иммуноблотинг вирусных белков

«Образцы для белкового электрофореза готовились следующим образом. Растительный материал гомогенизировали в жидком азоте и экстрагировали в 50 мМ калий-фосфатного буфера pH 7.4» (Калошин, 1999). К 5-10 мкл экстракта добавляли такое же количество Sample буфера. Перед фракционированием в ПААГ смесь прогревали в кипящей воде 2-5 мин.

«Белки фракционировали в 10% SDS-полиакриламидном геле по методу Лаеммли» (Калошин, 1999). Трансфер белков на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли в аппарате 2117 Multiphor II Electrophoresis Unit под действием электрического тока.

«Мембраны инкубировали в 20 мМ Трис-буфере, pH 7,5, содержащем 50 мМ NaCl и 3% бычьего сывороточного альбумина в течение 2 часов при комнатной температуре или 18 часов при +4°C, промывали дистиллированной водой и инкубировали с антисывороткой в течение часа» (Калошин, 1999). Затем мембраны промывали буфером, содержащим детергент (0,05% Tween 20), и инкубировали с конъюгатом антимышиных антител несущих люминесцентную метку су-3, в течение 60 минут при комнатной температуре. Результаты определяли проявлением мембран с помощью программного обеспечения прибора Typhoon 9200 variable mode imager.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Анализ изменений в геноме X-вируса шалота, персистирующего в вегетативно размножаемом шалоте

«Открытый и описанный в России X вирус шалота был выделен из растений *Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don. (селекционный образец N803), инокулированных экстрактом растений шалота монгольского сорта Тагар, инфицированных потивирусом желтой карликовости лука (ВЖКЛ)» (Архипов, 2013).

«Было обнаружено, что гибкие вирусные частицы, накапливающиеся в значительных количествах в растениях шалота N803, не принадлежат ВЖКЛ, а представляют собой вирионы нового, неизвестного ранее вируса, ставшего типовым для нового рода *Allexivirus*». (Архипов, 2013; Kanyuka et.al., 1992).

«Впоследствии данный, российский изолят X вируса шалота, использованный в настоящей работе, поддерживали в течение, по крайней мере, двадцати лет в вегетативно размножаемых растениях шалота селекционного образца N803, не инфицированных карла- или потексвирусами, то есть в условиях моноинфекции.

Задачей настоящей работы был анализ тех изменений, которые произошли в вирусном геноме в процессе столь длительной репродукции» (Архипов, 2013).

Препарат ХВШ выделялся из зараженных растений шалота. «Последовательность концевых районов генома X вируса шалота определяли с помощью набора для быстрой амплификации концов РНК (FirstChoice RLM-RACE Kit, Ambion)» (Архипов, 2013). «Для определения последовательности основной части генома использовались пятнадцать пар специфических олигонуклеотидов (Таблица 5), созданных на основе ранее определенной последовательности генома ХВШ (Kanyuka et. al., 1992)» (Архипов, 2013).

Таблица 5. Структура праймеров, используемых для амплификации фрагментов кДНК генома Х вируса шалота.

Обозначение праймера	Нуклеотидная последовательность	Локализация
N-область		
Sh-N-1 P	GCT-TCT-AAG-AAA-GCT-ACG-GCT-ATA	195 - 212
Sh-N-1 M	TCT-GAG-GCG-TGG-TAG-ACC-CAT-AT	952 - 930
Sh-N-2 P	CTT-ACG-GCA-CTC-TCA-AAT-GGC-T	745 - 766
Sh-N-2 M	CGA-ACT-CTC-AAG-TTG-GTG-AAA-CCA	1493 - 1470
Sh-N-3 P	AAA-CAT-CTT-ACG-CTG-CCC-TGC-T	1288 - 1309
Sh-N-3 M	CAT-GCT-TCG-ATC-AGC-TTG-TCA-AG	2038 - 2016
Sh-N-4 P	GTT-TCC-TTG-CGAGTG-CGG-CA	1838 - 1857
Sh-N-4 M	GTC-TTT-GTT-GAA-ATA-AAC-AGG-GCG-AAT	2588 - 2562
Sh-N-5 P	ATG-CGT-GTC-CAA-AAC-CCT-CAG-A	2377 - 2398
Sh-N-5 M	GGC-GTT-GAT-CTC-CAG-TCA-GTA-T	3135 - 3114
Sh-N-6 P	AAC-TAT-AAA-CCT-CGC-TAA-CGA-CTG	2930 - 2953
Sh-N-6 M	TAT-GTG-TCT-TAG-TGG-GCA-CAT-CTT-T	3678 - 3654
Sh-N-7 P	CGA-GGT-GCT-CTA-CAC-GGC-ATT	3473 - 3493
Sh-N-7 M	GCC-ATG-GTC-GTT-GTT-AGA-AGT-AC	4222 - 4200
Sh-N-8 P	CTC-TGC-GCA-CTT-ACC-TCT-CGA-A	4021 - 4042
Sh-N-8 M	GCT-TTG-AGA-CTG-AAT-AAA-CTC-TCA-GA	4690 - 4665
Sh-N-9 P	TCA-TTA-AGA-CTC-ATG-CGA-AGA-CCT-T	4459 - 4483
Sh-N-9 M	CAG-AAG-CTG-GGT-GTT-CCG-TAT-T	5133 - 5112
Sh-N-10 P	GAAAGGTATGCAACCTCCCGAGT	4937 - 4959
Sh-N-10 M	CTAAGGTGGATTTGCCGGAACCA	5432 - 5410
C-область		
Sh-C-1P	CCA-CTT-ATT-TCG-AAC-ATC-TTG-GGA	5207 - 5230
Sh-C-1M	CGG-ATG-AGT-GAT-ACA-CGA-GAG-T	5919 - 5903
Sh-C-2 P	CCATCTGCAGCTTCTTACAATCACT	6036 - 6061
Sh-C-2 M	GAAATTTGAGTGGTAGAACCCGTGA	6726 - 6701
Sh-C-3 P	GAC-CTA-AAA-CTG-GAT-CAT-CAC-CAA	6199 - 6222
Sh-C-3 M	CCA-AAC-GAC-TCA-TTA-ACG-GGC-AA	6825 - 6803
Sh-C-4 P	AGA-TGT-CGA-ACC-GGT-AGG-CCA	4858 - 4851
Sh-C-4 M	AGT-AAT-GGT-TAA-TTT-AAG-GGGA-AGT-GCT	7339 - 7320
Sh-C-5 P	TAG-TTG-TGT-CAA-GCC-TCA-ACA-ACA-T	7110 - 7134
Sh-C-5 M	CCT-CTT-AGC-TTG-TAA-GGT-GTC-CA	7854 - 7832

«В результате был получен набор фрагментов ДНК (рис. 11), перекрывающихся между собой, а также с последовательностями, определенными для концевых районов генома» (Архипов, 2013).

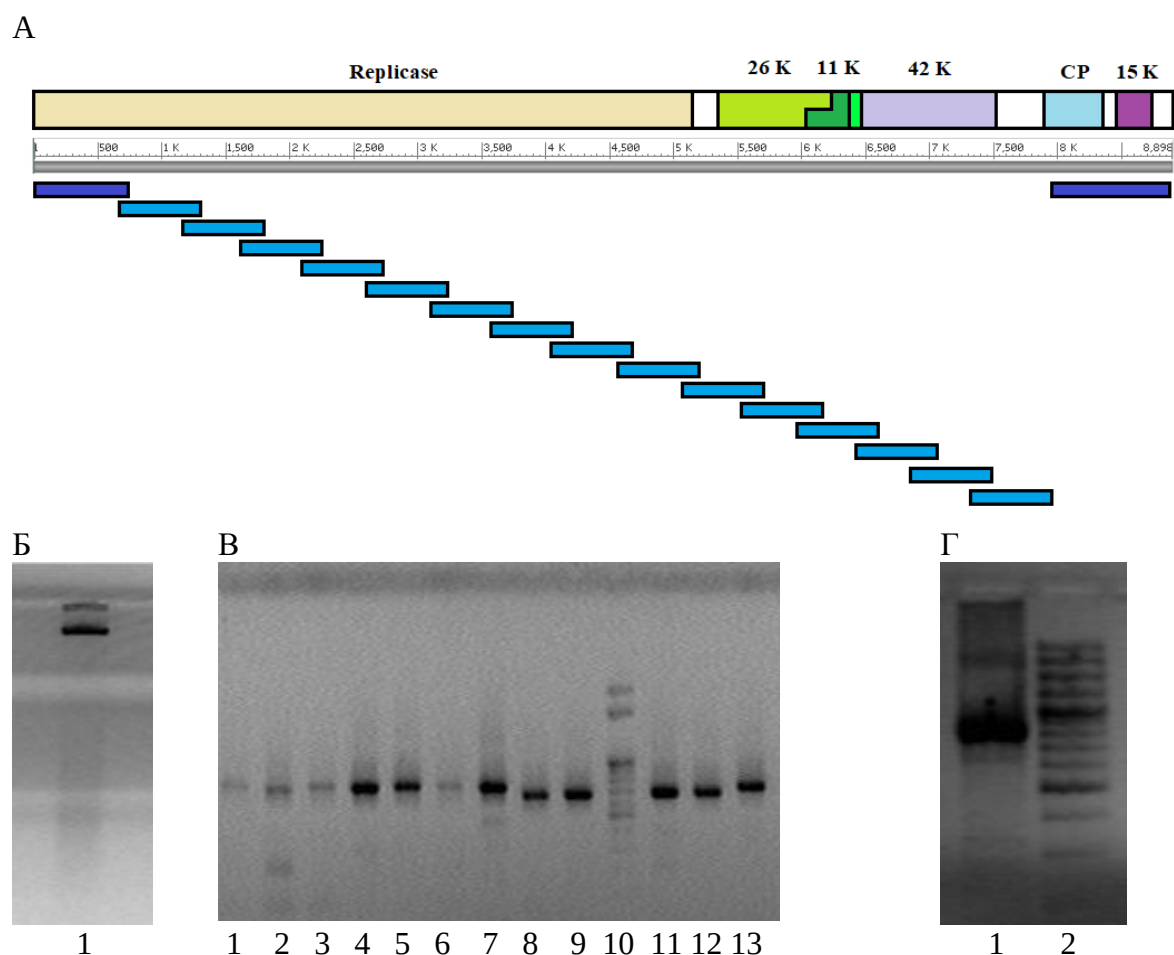


Рисунок 11.

(А) Схема амплификации генома X вируса шалота. Зеленым цветом отмечены концевые фрагменты, голубым – фрагменты амплифицирующиеся внутри генома; (Б) Электрофореграмма РНК ХВШ, выделенной из очищенного вирусного препарата, и фракционированной в 0.8% агарозном геле; (В) Электрофореграмма ряда амплифицированных фрагментов генома ХВШ, соответствующих позициям праймеров: N1 (1 трек), N2 (2 трек), N3 (3 трек), N4 (4 трек), N5 (5 трек), N6 (6 трек), N7 (7 трек), N8 (8 трек), N9 (9 трек), C2 (11 трек), C3 (12 трек), C4 (13 трек); (Г) Фореграмма амплифицированного фрагмента, соответствующего 3' – концевому участку геномной РНК ХВШ, включая последовательность, кодирующую белок р15, (1 трек). Для фореграмм В и Г использовался маркер молекулярных масс M25 100-3000 bp DNA Ladder (НПО Сибэнзим», Россия).

«Полученные фрагменты клонировали в составе вектора pAL-TA (Евроген) и секвенировали. Полная последовательность РНК ХВШ, длина которой составила 8898 нуклеотидных остатков, не считая поли(А)-концевой части, была депонирована в базе данных GeneBank (номер JX310755).

Сравнение полученной последовательности генома ХВШ с опубликованной ранее последовательностью родительского изолята (Kanyuka et. al., 1992), проведенное с помощью программы ClustalW2, показало их сходство на 92,6%» (Архипов, 2013).

«Уровень дивергенции, соответственно, составляет 7.4%, или 0.37% в год, или 31 мутация на геном в год, что примерно в 3 раза превышает уровень мутаций у других РНК-содержащих вирусов» (Архипов, 2013).

«Различие двух последовательностей могло быть обусловлено либо ошибками, допущенными при определении первичной структуры генома родительского изолята, и в этом случае можно было ожидать, что выявленные нуклеотидные замены распределены равномерно по всей длине генома, либо изменениями, произошедшими в течение двадцати лет культивирования вируса в вегетативно размножаемых растениях. В последнем случае, принимая во внимание тот факт, что интенсивность давления естественного отбора может быть различной для разных функциональных элементов генома, следует ожидать, что обнаруженные замены распределены неравномерно, концентрируясь в отдельных районах генома» (Архипов, 2013).

«Для анализа распределения выявленных замен в последовательности генома ХВШ использовалась программа PLOTCON, с помощью которой был построен график сходства, основанный на выравнивании новой и ранее опубликованной последовательностей (Рис. 12)» (Архипов, 2013).

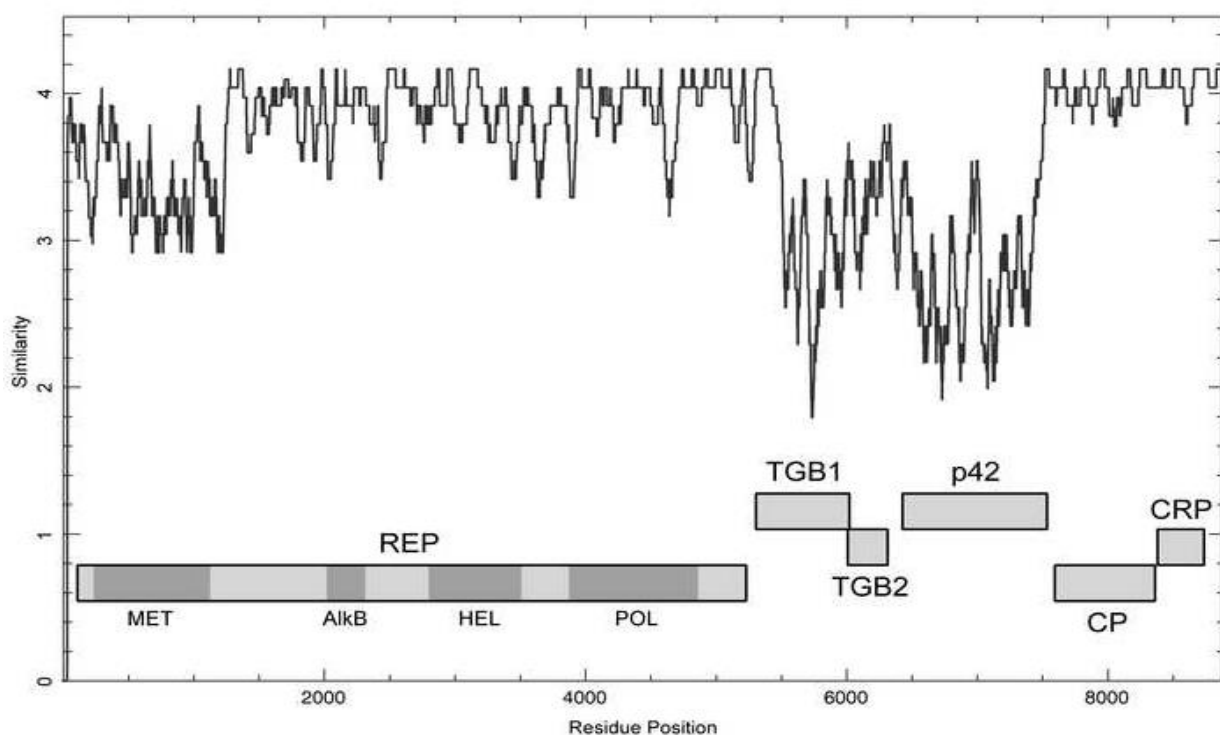


Рисунок 12. Схема сходства выравненных нуклеотидных последовательностей ShVX JX310755 и установленной ранее (Kanyuka et al., 1992), полученная с использованием сетевого приложения PLOTCON с шагом в 60 оснований. Сходство последовательностей представлено напротив их положений. Светло-серым цветом отмечены области генов ShVX. Темно-серым цветом отмечены консервативные области вирусной репликазы.

«Построенный график выявил, что различные районы генома ХВШ проявляют разную степень сходства нуклеотидных последовательностей родительского и дочернего изолятов ХВШ» (Архипов, 2013).

«Район, включающий открытые рамки считывания 2, 3 и 4 (гены белков ТБГ1, ТБГ2 и р42), содержит существенно большее число отличий между двумя последовательностями, чем другие районы генома (Рис. 12). Кроме того, район, кодирующий домен МЕТ вирусной репликазы, оказался более вариабельным, чем районы, кодирующие другие домены того же белка,

но менее вариабельным, чем район генов ТБГ1, ТБГ2, р42 (Рис. 12)» (Архипов, 2013).

«Таким образом, можно сделать вывод, что, по крайней мере, часть наблюдаемых различий между геномными последовательностями родительского и дочернего изолятов ХВШ представляет собой результат изменений, произошедших в период персистенции вируса в вегетативно размножаемых растениях шалота N803» (Архипов, 2013).

«Попарные сравнения аминокислотных последовательностей кодируемых белков показали, что большее количество различий нуклеотидных последовательностей, найденное для домена МЕТ в сравнении с другими доменами репликазы, не приводит к большему количеству аминокислотных замен: идентичность аминокислотных последовательностей доменов репликазы составила 98,7% для МЕТ, 96,6% для AlkB, 99,6% для HEL и 99,1% для POL. С другой стороны, уровень сходства аминокислотных последовательностей белков ТБГ1, ТБГ2 и р42, составляющий менее 90% соответствовал уровню сходства нуклеотидных последовательностей данных генов и был существенно ниже, чем уровень сходства капсидного (КБ) и цестеин богатого (ЦББ) белков (Таблица 6)» (Архипов, 2013).

Таблица 6. Сходство нуклеотидных последовательностей генов и аминокислотных последовательностей кодируемых ими белков, вычисленное на основании сравнения родительского и дочернего изолятов русского штамма ХВШ

Ген ХВШ и кодируемый белок.	Длина гена, нукл.	Идентичность нуклеотидной последовательности, %	Размер белка, а.о.	Идентичность аминокислотной последовательности, %
ОРС1 (репликаза)	5159	94.9	1719	93.8
ОРС2 (ТБГ1)	726	86.9	241	89.6
ОРС2 (ТБГ2)	312	88.8	103	89.3
ОРС3 (р42)	1143	82.4	380	87.6
ОРС4 (КБ)	789	97.7	262	96.2
ОРС5 (ЦББ)	387	99.0	128	98.4

«Кроме того, было обнаружено, что аминокислотные замены в кодируемом ORC2 белке ТБГ1 распределены неслучайным образом. Известно, что белок ТБГ1 ХВШ, как и родственные ему белки других вирусов, геном которых кодирует ТБГ, включает семь консервативных мотивов, характерных для НТФазного/хеликазного домена (Morozov, 2003) которые в сумме 39% общей длины белка. При этом только пять из 25 аминокислотных замен (20%) локализуются в последовательностях консервативных мотивов, тогда как на кодирующие их районы гена приходится 30% нуклеотидных замен» (Архипов, 2013). «Эти наблюдения свидетельствуют в пользу того, что различия между родительским и дочерним изолятами ХВШ являются результатом адаптационных изменений, произошедших в вирусном геноме» (Архипов, 2013).

«Уровень сходства аминокислотных последовательностей капсидного белка родительского изолята ХВШ (Kanyuka et al., 1992) и дочернего изолята, исследованного в настоящей работе, составляет менее 97%, что сравнимо с уровнем сходства между КБ различных штаммов ХВШ: идентичность последовательности КБ дочернего изолята с КБ индийского и новозеландского штаммов ХВШ составила 87,8% и 97,0%, соответственно. Эти данные показывают величину эволюционной дистанции между родительским и дочерним изолятами русского штамма ХВШ» (Архипов, 2013).

«Полученные в настоящей работе данные о различных уровнях накопления мутаций в разных районах генома ХВШ показывают, что функциональные модули вирусного РНК-генома могут испытывать неодинаковое давление естественного отбора и, как следствие, эволюционировать разной скоростью» (Архипов, 2013).

«Можно предположить, что высокий уровень изменчивости, обнаруженный для района генома ХВШ, который кодирует белок р42 и белки ТБГ, необходимые для межклеточного транспорта вирусной инфекции, говорит о том, что белок р42 также может быть связан с какими-либо аспектами вирусного транспорта. Эта гипотеза не противоречит имеющимся экспериментальным данным о взаимодействии белка р42 с вирионами, поскольку для некоторых вирусов, не относящихся к роду *Allexivirus*, показано (Dolja et al., 2006), что взаимодействие вирус-специфических белков, не входящих в состав спирального капсида, с вирусными частицами необходимо для транспорта вирусной инфекции» (Архипов, 2013).

Причиной наблюдаемых изменений, вероятно, является адаптация к новому растению-хозяину.

2. Исследование супрессорной активности белков кодируемых 3' – областью генома X вируса шалота

Как известно, «эффективной стратегией, выработанной фитопатогенными вирусами в ходе эволюции и позволяющей им преодолевать действие РНК-интерференции, является блокирование генетического сайленсинга посредством специальных белков – супрессоров РНК интерференции» (Scholthof et.al., 2005). Таким образом, идентификация белков-супрессоров X вируса шалота, способствовала бы пониманию природы молекулярных механизмов используемых ХВШ для репродукции в зараженных растениях.

Исследование возможного наличия функции супрессии РНК-интерференции, у ряда белков кодируемых геномом X вируса шалота, проводилось с помощью агробактериальной транзientной экспрессирующей системы репортерного белка (зеленого флуоресцирующего белка, GFP) в листьях табака (*N. Benthamiana*) в присутствии специфического индуктора РНК-интерференции и известного или предполагаемого вирусного супрессора.

Использование данной технологии включает создание вектора на основе бинарной плазмиды, несущей вставку полноразмерной копии амплифицируемых участков, соответствующих генам белков экспрессируемых X вирусом шалота.

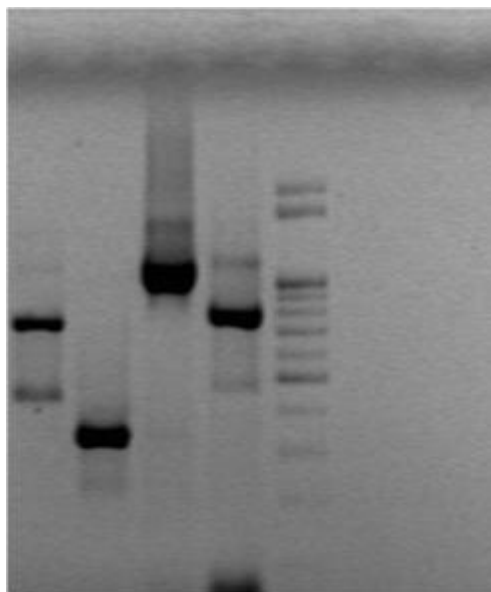
При конструировании праймеров для амплификации индивидуальных фрагментов вирусной кДНК и последующего клонирования их в бинарный вектор были использованы данные актуальной информации о геномной организации X вируса шалота настоящего исследования, а также информация, полученная нами и другими исследователями ранее.

С целью клонирования отдельных фрагментов вирусной кДНК в бинарный вектор, в структуру праймеров были включены последовательности сайтов рестрикции NcoI и XbaI, (Таблица 7) отсутствующие в последовательностях исследуемых фрагментов. Кроме того, в последовательность праймеров с сайтом рестрикции NcoI после иницирующего кодона и следующего за ним гуанилового остатка включали динуклеотид TG. Возникающий таким образом триплет GTG индуцировал включение в соответствующие полипептиды после N- концевого метионина остатка валина, не влияющего на активность белка *in vivo*.

Таблица 7. Структура праймеров, использованных в настоящей работе для амплификации индивидуальных фрагментов вирусной кДНК и клонирования их в бинарный вектор. ** красным отмечен сайт рестрикции NcoI, лиловым – сайт рестрикции XbaI и голубым – валиновый триплет GTG.

Название.	Нуклеотидный состав.	Позиции отжига на последовательности NC_003795.1 базы данных NCBI.	Размер амплифицируемого участка.
Hel-nco	CGC-CAT-GCTG-AAG-ACT-GAC-CTC-CT**	5316-5331	725
Hel-xba	GCT-CTA-GAT-CAG-GGG-GCG-GGG-CAA-A	6024-6040	
Mem-nco	CGC-CAT-GCTG-AGC-TTT-GCC-CCG-CC	6019-6031	311
Mem-xba	GCT-CTA-GAT-TAA-TGA-GGT-TGA-GAA-C	6313-6329	
SHVX42K-P	CGC-CAT-GGT-AAT-TGT-CAC-GAC-CTT-C	6379-6400	1143
SHVX42K-M	GCT-CTA-GAT-TAA-CAC-AGA-CCT-TCA-CCC-CTA	7501-7522	
CP- Nco	CGC-CAT-GCTG-AAC-GAA-GAC-GAT-TTG-AAT	7547-7566	789
CP-xba	GCT-CTA-GAT-CAG-AAA-GTT-ATC-ATC-GGC-G	8315-8335	
15K-F	CGC-CAT-GCTG-CA-TCC-CCA-CGA-TCT-AAA	8335-8353	359
15K-R	GCT-CTA-GAT-TAT-AAT-TTA-AGA-GAT-TTA-ATT-AA-TAG	8720-8694	

Ампликоны, полученные с использованием этих праймеров и соответствующие открытым рамкам считывания генов кодирующих белки ХВШ, фракционировали методом электрофореза в агарозном геле (Рис. 13, треки 1-4) и секвенировали.



1 2 3 4 5

Рисунок 13. «Анализ ампликонов, соответствующих участкам генома ХВШ, кодирующим TGBp1 (трек 1), TGBp2 (трек 2), p42 (трек 3) и капсидный белок p37 (трек 4), методом электрофореза в агарозном геле; маркер молекулярных масс M25 100-3000 bp DNA Ladder (НПО Сибэнзим», Россия)» (Архипов, 2011).

Полученные последовательности содержали фланкирующие сайты рестрикции NcoI и XbaI, иницирующий кодон и соответствующие открытые рамки считывания (без сайтов NcoI и XbaI), то есть все элементы, необходимые для клонирования в бинарный вектор и дальнейшего использования в системе агробактериальной транзientной экспрессии исследуемых белков.

Библиотека плазмид, содержащих вставку с данными последовательностями, могут быть использованы в дальнейших молекулярно-биологических экспериментах с Х вирусом шалота.

При исследовании локального сайленсинга, листья интактных растений *N. benthamiana* инокулировали суспензией клеток агробактерий, трансформированных рекомбинантными плазмидами, несущими ту или иную генетическую конструкцию (Таблица 8), и уровень экспрессии репортерного гена оценивали по результатам иммуноблотинга и флуорометрии экстрактов экспериментальных растений по прошествии 7 дней после инъекции.

Таблица 8. Обозначение и принципиальные схемы генетических конструкций, использованных в настоящем исследовании в процессе агробактериальной транзитной экспрессии репортерного гена GFP в листьях *N. benthamiana*.

35S- промотор, кодирующая вставка, 3'- концевой не транслируемый участок РНК β вируса штриховатой мозаики ячменя и 35S- терминатор обозначены знаками , , V и , соответственно.

EV  	Вектор (pLH 7000*) без вставки (“пустой”, Empty Vector).
V-GFP   GFP 	Вектор, несущий вставку, кодирующую растворимую форму зеленого флюоросцеирующего белка (GFP).
V-dsGF   GF FG 	Вектор, несущий конструкцию, играющую роль индуктора РНК-интерференции: 5'-проксимальный участок (342 нукл.) модифицированного гена GFP (GFPC3), 3'-концевой нетранслируемый участок РНКβ вируса штриховатой мозаики ячменя и GFPC3 в обратной ориентации.
V-p19   p19 	Вектор, несущий вставку, кодирующую белок-супрессор p19 томбусвирусов.
V- ShVX-ORF2, V- ShVX-ORF3, V- ShVX-ORF4, V- ShVX-ORF5, V- ShVX-ORF6	Векторы со вставками открытых рамок считывания 2 - 6 ХВШ, кодирующих белки с предполагаемой супрессорной активностью.

Агроинъенкцию *Nicotiana benthamiana* осуществляли в следующих вариантах: 1. Репортерный ген (GFP) + пустой вектор; 2. GFP + индуктор РНК интерференции (dsGFP) + пустой вектор; 3. Известный супрессор (p19) + dsGFP + репортерный ген; 4. 4,5,6,7 последовательность, кодирующая исследуемый белок + индуктор РНК интерференции (dsGFP) + репортерный ген.

Шпилечная структура, образующаяся при экспрессии конструкции V-dsGF, является индуктором РНК сайленсинга и при ее наличии экспрессия маркерного белка GFP не происходит, тогда как присутствие белка-супрессора, Р19, ингибирует данный процесс, что позволяет GFP экспрессироваться в растениях табака. Соответственно наличие экспрессии GFP в вариантах 5-8, может подтвердить функцию супрессора РНК сайленсинга у какого-либо из исследуемых нами белков 3' области ХВШ.

В случае если исследуемый белок не обладает супрессорной функцией, маркерный белок GFP экспрессироваться не будет, за счет действия индуктора РНК сайленсинга экспрессируемого конструкцией V-dsGFP.

Как следует из результатов, представленных на рис. 14 а и б, восстановление уровня экспрессии GFP, сниженного в результате действия конструкции V-dsGF, играющей роль индуктора РНК-интерференции, наблюдается только в присутствии белка-супрессора томбусвирусов (конструкция V-p19). При этом, ни один из протестированных белков ХВШ функцией супрессора локального РНК-сайленсинга не обладает.

При изучении системного сайленсинга использовалась конструкция экспрессирующая TGBp1 белок ХВШ (ORF2), потекс- и карлавирусные гомологи которого обладают функциями супрессора РНК-интерференции.

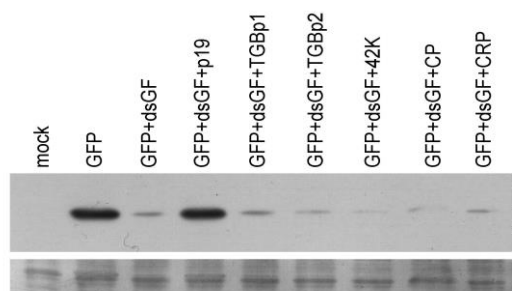
Суспензию клеток агробактерий, несущих конструкцию V- ShVX-ORF2, инъецировали в листья нижнего яруса трансгенных растений *Nicotiana benthamiana* линии 16с экспрессирующих зеленый флюоресцентный белок медузы (GFP), и через 14 - 16 дней интенсивность флуоресценции GFP в листьях верхнего яруса оценивали методом флуорометрии (Рис. 14 в).

Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что в отличие от своих потекс- и карлавирусного гомологов, TGBp1 белок ХВШ (ORF2) не ингибирует также и системный РНК - сайленсинг.

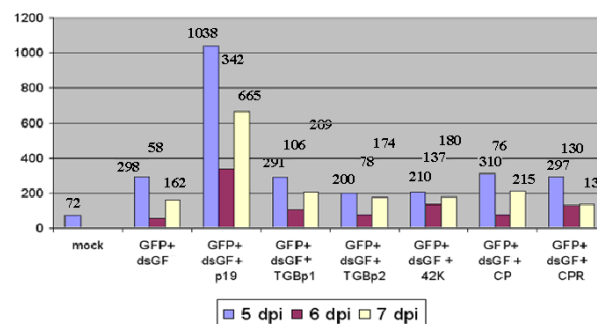
«Таким образом, результаты настоящего исследования позволяют сделать вывод, что ХВШ репродуцируется в растениях шалота в отсутствии собственного активного белка-супрессора РНК сайленсинга» (Архипов, 2017).

Не исключено, что ингибирование РНК сайленсинга, необходимое для успешной репродукции ХВШ в исследуемой системе, может быть обусловлено различными механизмами, например способностью вируса каким-то образом полностью подавлять или изменять экспрессию генов антивирусного фитоиммунитета.

A.



Б.



В.

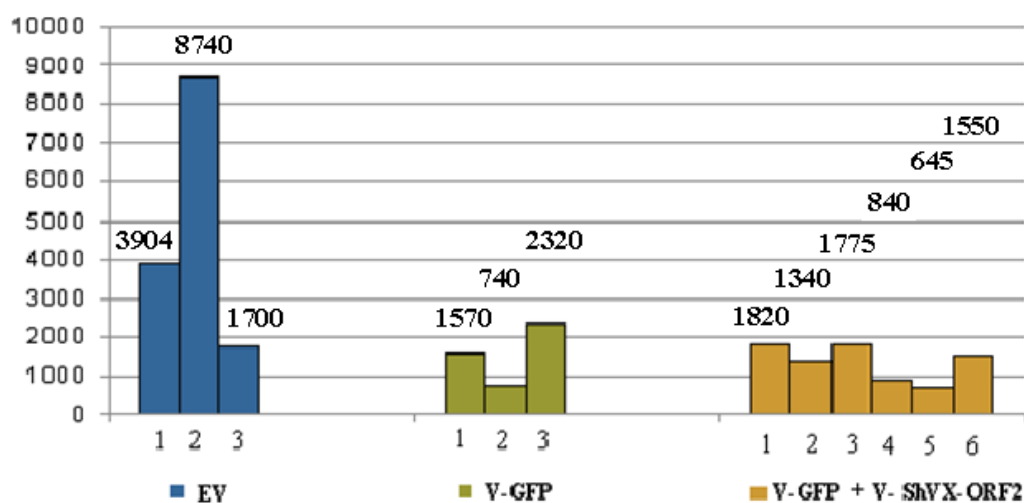


Рисунок 14. Детекция GFP методами иммуноблотинга и флуорометрии.

(А) Иммуноблотинг экстрактов листьев *N. Benthamiana* через 4 дня, после инъекции клетками агробактерий, несущих генетические конструкции для проверки супрессорной активности белков 3' области ХВШ;

(Б) Флуорометрия экстрактов листьев *N. Benthamiana* через 5, 6 и 7 дней после инъекции клеток агробактерий, несущих генетические конструкции для проверки супрессорной активности белков 3' области ХВШ.

(В) Флуорометрия экстрактов листьев GFP-трансгенной *N. benthamiana* (линия 16 с) через 14 дней после инъекции клеток агробактерий, трансформированных рекомбинантной плазмидой, несущей конструкцию ShVX-ORF2. Флуоресцентный спектрометр LS 55, PerkinElmer. Значения светового потока при отношении Exctitation/ Emission = 395/509, обозначены жирным шрифтом.

3. Подавление экспрессии факторов РНК-сайленсинга при репродукции ХВШ

«Фитовирусная инфекция в растениях является мощным экзогенным индуктором РНК-интерференции вызывая эффект специфического расщепления репликативных (двухцепочечных) форм вирусных РНК растительными дайсер-подобными белками (DCL)» (Архипов, 2011).

«Деградация вирусной РНК сопровождается образованием вирус-специфических коротких интерферирующих РНК (siRNA), участвующих в формировании эффекторного комплекса RISC, в результате функционирования которого вирусные РНК, комплементарные малым интерферирующим РНК, специфически разрушаются. Продукты расщепления вирусных РНК в свою очередь служат матрицами для синтеза клеточными РНК-зависимыми РНК-полимеразами двухцепочечных РНК, в результате расщепления которых DCL-белками формируются вторичные siRNA, блокирующие системное распространение вируса (Ding, 2007)» (Архипов, 2017).

«В свою очередь, вирусы используют различные механизмы позволяющие ингибировать процесс РНК-сайленсинга, например кодируют специальные белки-супрессоры. Однако, данные, полученные в настоящей работе, дают основания предполагать, что ХВШ успешно репродуцируется в отсутствие собственного активного белка-супрессора и, следовательно, преодолевает иммунный барьер РНК-сайленсинга с помощью каких-то иных молекулярных механизмов» (Архипов, 2017).

«В настоящей работе была поставлена задача экспериментальной проверки гипотезы, согласно которой ХВШ предотвращает РНК-сайленсинг в результате специфического ингибирования транскрипции генов дайсер-подобных белков (DCL) и РНК-зависимой РНК полимеразе (RDR), что предполагает сравнительное исследование уровней представленности

соответствующих транскриптов в корнях и листьях здоровых и инфицированных ХВШ растений шалота» (Архипов, 2017).

Фитовирусная инфекция кардинальным образом изменяет структуру транскриптома растения-хозяина (Postnikova, 2012), что делает выбор гена домашнего хозяйства (housekeeping genes), экспрессия которого свободна воздействий внешних и внутренних факторов, в качестве нормалайзера оптимальным, при использовании метода ПЦР в реальном времени для оценки уровней относительной экспрессии изучаемых транскриптов.

Мы приняли решения использовать в качестве гена-нормалайзера 18S РНК, что обусловило необходимость идентификации данного гена в шалоте.

До проведения настоящего исследования какая-либо информация о дайсер-подобных белках, РНК-зависимой РНК полимеразе и 18S РНК *Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don в мировой научной литературе отсутствовала. Число генов DCL-белков в геноме шалота и эволюционные взаимосвязи между ними так же остаются неизвестными.

«На первом этапе работы основную задачу настоящего исследования предполагалось решить с помощью диагностических праймеров, соответствующих консервативным участкам геномных последовательностей DCL - белков арабидопсиса (Margis et. al., 2006).

Данный экспериментальный подход основан на концепции, согласно которой для всех покрытосеменных и, возможно, для всех многоклеточных растений характерен базовый набор четырех типов DCL-белков, обладающих высоким уровнем гомологии; имеющиеся экспериментальные данные свидетельствуют о том, что такие праймеры действительно позволяют осуществлять идентификацию DCL-белков 1-4 методом полимеразной цепной реакции не только в арабидопсисе, но также - в ячмене, кукурузе, хлопчатнике и люпине (Margis et. al., 2006)» (Архипов, 2011).

«В наших экспериментах, с помощью указанных праймеров, были надежно идентифицированы DCL-белки 1-4 в растениях арабидопсиса, однако применение их на ядерной ДНК или кДНК шалота оказалось безуспешным. Ампликоны либо не синтезировались вовсе, либо продукты реакции не обладали сколько-нибудь выраженной гомологией с последовательностями, кодирующими DCL-белки 1-4» (Архипов, 2011).

«Мы интерпретировали эти данные как свидетельство выраженной дивергенции генов DCL-белков *A. thaliana* и *Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don» (Архипов, 2011).

«В дальнейшем мы предприняли попытку подойти к решению стоящей перед нами задачи, используя базу данных GarlicESTdb, содержащую информацию о 21,595 EST (Expressed Sequence Tags) – последовательностях *Allium sativum* (Kim et. al., 2009). Использование в аналогичных целях базы данных по *Allium cepa* (Joseph et. al., 2004) содержащей значительно меньшее число EST-последовательностей, оказалось безуспешным» (Архипов, 2011).

«В базе данных GarlicESTdb, посредством программы BLAST/tblastx, которая транслирует предложенную нуклеотидную последовательность и затем сравнивает между собой аминокислотные последовательности, был осуществлен поиск EST-последовательностей, кодирующих полипептиды, обладающие высоким уровнем гомологии с различными DCL-белками» (Архипов, 2011).

«На рис. 15 представлен результат такого скрининга с участием матричной (м)РНК AtDCL2; аналогичные данные были получены с участием мРНК всех известных растительных DCL-белков)» (Архипов, 2011).

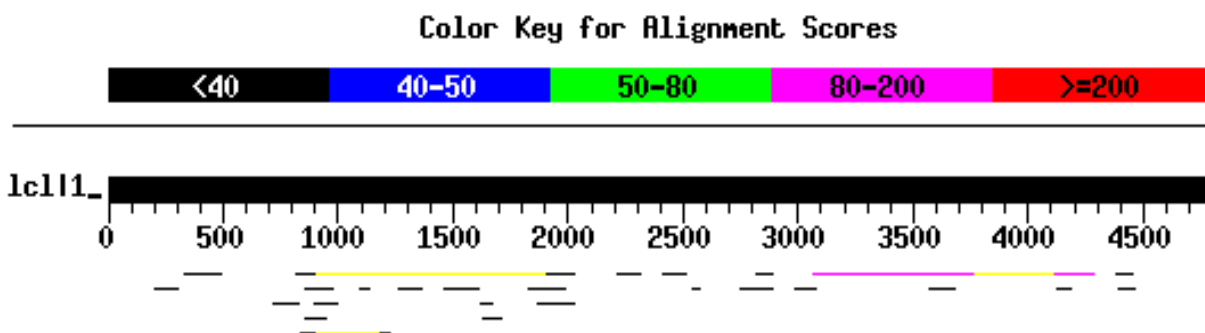
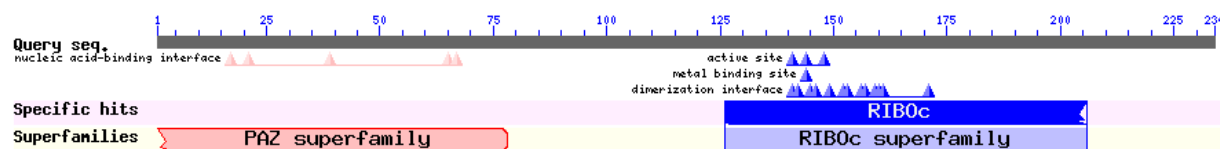


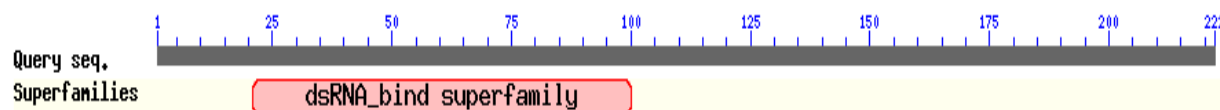
Рисунок 15. «Результаты скрининга EST-последовательностей, комплементарных матричной РНК AtDCL2, в базе данных GarlicESTdb. Обнаруженные EST соответствуют последовательностям мРНК в интервалах 3100 – 3750 и 4100 – 4250 нуклеотидов» (Архипов, 2011).

«В результате были выбраны три EST-последовательности: EPP005KGAA12S003959 (783 bp), EPP004KGAA12S004834 (679 bp) и EPP004KGAA12S005240 (675bp). Все они содержали по одной открытой рамке считывания, и степень гомологии транслируемых с этих последовательностей полипептидов с различными DCL-белками арабидопсиса, риса и тополя варьировала в пределах 60-70%. При этом соответствующий компьютерный анализ выявил в составе исследуемых полипептидных цепей характерные для молекулы DCL-белка dsRNA bind, PAZ и RIBOc (RNase IIIa и RNase IIIb) домены (Рис.16)» (Архипов, 2011).

EPP005KGAA12S003959 (783bp)



EPP004KGAA12S004834 (679bp)



EPP004KGAA12S005240 (675bp)

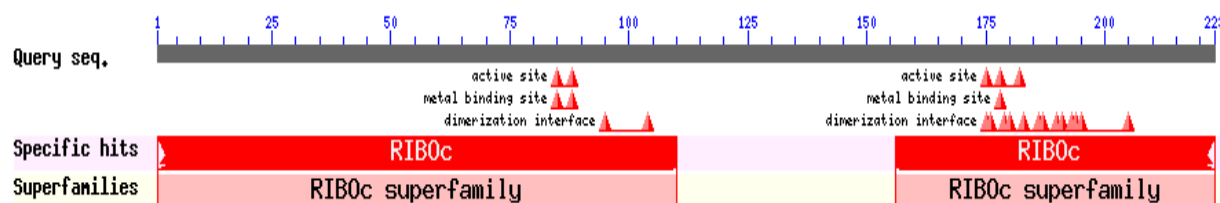


Рис 16. «Результаты компьютерного доменного анализа полипептидов, транслирующихся с нуклеотидных EST-последовательностей EPP005KGAA12S003959, EPP004KGAA12S004834, PP004KGAA12S005240» (Архипов, 2011).

«Разработанные праймеры (Таблица 9), соответствующие участкам трех выбранных EST-последовательностей, были использованы для дальнейшей работы с транскриптомом шалота. Амплифицируемые с данных праймеров фрагменты, соответствующие участкам трех выбранных EST-последовательностей, экстрагировали из геля, очищали и секвенировали. Ниже представлены их нуклеотидные последовательности» (Архипов, 2011).

Таблица 9. Праймеры, амплифицирующие фрагменты нуклеотидных последовательностей, кодирующих DCL-белки в растениях шалота.

Обозначение праймера	Нуклеотидная последовательность
E S T - последовательность EPP004KGAA12S005240	
L-38	TATGAGCTGGCCATTGCTAA
R-552	GCATCCCCAAGATACTCCAA
E S T - последовательность EPP004KGAA12S004834	
L-133	GTCCCCGTTTTGTGATTGAC
R-632	AGCCATCAAAACCTGCTCAC
E S T - последовательность EPP005KGAA12S003959	
L-106	TGAAGAGCAGGGAAACTCTCA
R-644	TCCTATCCGGCATAAGTTGG

EST3959–L-106 + EST3959–R-644

GTCAGCCTGTTCTAATATGGGATAAACTTGAAATGGAGCAATCA
ATCCTTACTTAATGGAAGGCATATATTTACTGTTCAAAATTTTCTCTCT
AGACGACGTCCGAAGCATAAGAAAGAAAATAGTTCCGCGGGAGTTGA
ATTGCCTCCGGAAGTTTGCAAAATCATTATGTCTCCAATTTGACTGAT
ATTCTATACTCATTCTCATTTGTTCCGTCGATTATGCATCGCGTAGAGT
CTATGCTCCTTGCTTCAAAATTAAAGTTGATTCATTCGGATCACTGCAT
GCAAAATGTCAATGTTTTCTACTACCAGGGTATTGGAAGCAATAACTAC
CAAGAAATGCCAAGAGGCATTTTCTTTGGAATCATTAGAAACCCTTGG
GGAATCGTTTCTCAAATACGCCGCAAGCCAACATTTGTTCAAGATAAA
CGAGCACCATCATCAAGGCACACATGCAACACACGCCACTGCTC

EST4834-L-133 + EST4834-R-632

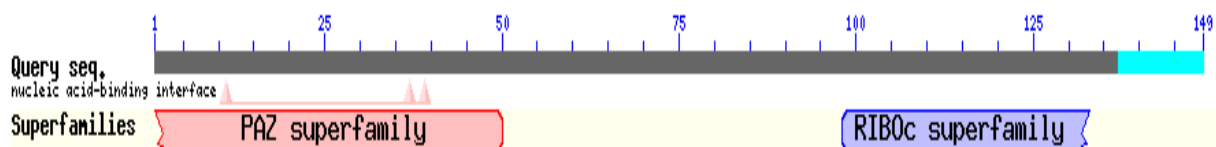
ACCCAGAGTCTCGCGACCTACCCTTTTTGTCCCCGTTTTGTGAGT
CCCCAAGTTGCGATTGACAAGGCTTTAAATATTTCTCAAGGTATCTG
CTTCAAAGTTGTCCAGTACAAAACGTAAGTGTAAAGGGGGAATATAAT
AAATTGAAACAAATTGCTAGTCTCGAAACAATAAAAAAACTTCACCA
GATTGGTGCAGTGTCTGATTATCTTTTACCAGTACCAGATGATAAAGC
AGAGCTTGATTCGGAAGAAAGTGGCTTCGAGTATAGTAGTGAACAAG
TTAGTTATTATCCAGGAGAGTTGGTTGATTCGTGGTCTTCGTATATCTG
TTACAGTTTATATCATTGCTACAAGATCACATTAAAAAATCAATTCCA
ATCTGCGTATTCGTTCAAGTATATTATTCTTGTGGTAAAATCAGATCTT
GGACTAGATCTAATTCTAACTCCTTGACTTGAAGAAGACCGGGGGTTT
GTCTTTGTAATGGGAAAAGTGGCCGTG

EST5240-L-38 + EST5240-R-552

CGTGCTGTCAGCGTGAGTATTTTACCCGAAGACTTTTTTTCGCGCTG
GGCAGACCTTGTACAGTAATTTGTAATGCAGATACAGAATCAGATATA
CATAACCAACAAGTCAATGGCAACATAATAGATGAAAGTGCATATGT
GAAATGCACAAAATCTCATAGGTGGGTTCATAAAAAACAATTGCAA
ATGTTGTTGAATCTCTAGTTGGAGCATTTCTTGTTCTTAGTGGATTAA
GCTGCAATCGCATTTCTTAACTGGCTTGGAATACAAGTTGACATTGAA
ATTTAGATATTTTAACATTTTACCCAAAAAACTTTTTTGATCTGGCCA
TACCTGAAACAATAAATGTTAATGCATATAAAAACTCGTAAAGACAT
AAGTTTAAAATCCATGGCCTTCTTCTTCATGCCTTCGTCCACCCTTCTT
ACAACAAGCACCCAGGAGGGTGCTATCAAAGATTGGAGTATCTTGGG
GATGCACAAATCTTGACTTTTCTGTCTAAGGT

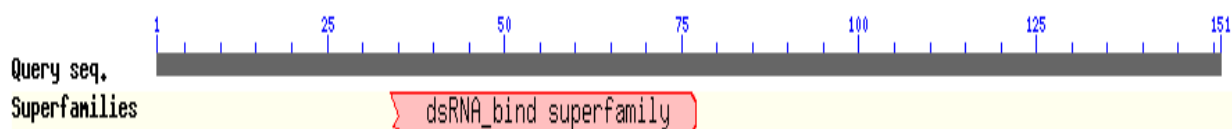
«Компьютерный анализ полученных последовательностей не выявил в базах данных NCBI последовательностей, обладающих сколько-нибудь заметной гомологией с исследуемыми; в то же время транслируемые с этих последовательностей полипептиды обладали высоким уровнем гомологии со всеми растительными дайсер-подобными белками и наибольшим (81%) - с DCL-белками тополя (*Populus trichocarpa*). При этом аминокислотные последовательности всех трех полипептидов не были идентичными, и в структуре каждого присутствовали различные, характерные для молекулы DCL- белка, домены (dsRNA bind, PAZ или RIBOc, Рис 17)» (Архипов, 2011).

А.
L-106 – R-644 [EPP005KGAA12S003959]



Б.

L-133 - R-632 [EPP004KGAA12S004834]



В.

L-38 – R-552 [EPP004KGAA12S005240]

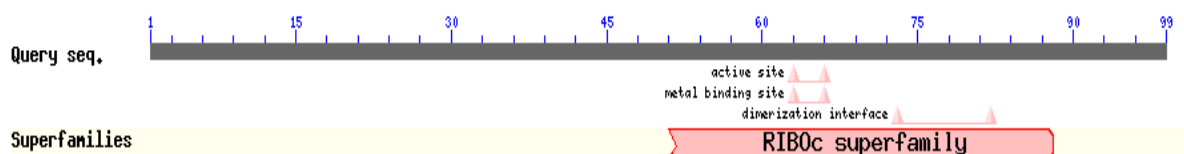


Рисунок 17. «Доменный анализ полипептидов, транслируемых с нуклеотидных последовательностей, амплифицированных с помощью пар праймеров: (А.) L-106 – R-644 [EPP005KGAA12S003959]; (Б.) L-133 - R-632 [EPP004KGAA12S004834]; (В.) L-38 – R-552 [EPP004KGAA12S005240]» (Архипов, 2011).

«Таким образом, впервые представлено доказательство экспрессии в растениях шалота нуклеотидных последовательностей, кодирующих три домена различных дайсер-подобных белков; кроме того, представленные данные позволяют сделать вывод о высокой степени дивергенции дайсер-подобных белков арабидопсиса и ряда других видов, относительно *Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don» (Архипов, 2011).

«При идентификации нуклеотидных последовательностей, кодирующих белки RDR в растениях шалота, использовался подход, апробированный нами для поиска нуклеотидных последовательностей DCL» (Архипов, 2011). Аналогичный метод использовался для поиска последовательности кодирующей 18s РНК шалота.

С использованием баз данных NCBI *Allium cepa* ESTdb (taxid:4679) и NCBI *Allium sativum* ESTdb (taxid:4682) были выбраны EST-последовательности, степень гомологии которых с различными последовательностями растительных RDR (EST677423, EST683932, EST672667) и 18s РНК (EST682433, 687635) варьировала в пределах 70-90%.

На основе установленных EST-последовательностей разработаны праймеры (Таблица 10), и фрагменты амплифицированные с использованием данных праймеров были секвенированы.

Последовательности фрагментов RDRP и 18s РНК шалота, установленные в результате секвенирования представлены ниже.

Таблица 10. Праймеры амплифицирующие участки гомологичные последовательностям растительных RDR и 18s РНК.

Название	Нуклеотидный состав
18s-132-F	TGG-ATT-GGA-GCC-TTG-TCT-TCT
18s-539-R	CCT-TCG-CCA-CTG-AAT-TTC-GA
Rdr-240-F	AGT-TCA-TGC-AGA-CCA-AAG-CG
Rdr-574-R	TCA-ACT-CCC-AAG-CAT-CGG-AT
Rdr-343-F	GTA-AAG-ATG-CCT-CCG-TCC-CT
Rdr-771-R	AAG-CTC-TTC-GAC-CAG-ACC-TC

RDRP:

AAATGCATCAACTTGCAGAGCTTGCGGCTGAGCAGTCGACTTCC
 CТААААССGGTAAAATAGTAAAGATGCCTCCGTCCCTGAAGCCCAA
 CTGTACCCTGACTTCATGGGCAAGGACAGTTCCCTTACCTACAAATCA
 GAGAAAATACTGGGCAGACTCTACAGAAAAATAAAGGATGCAGCAAA
 CGAGGACAGCCATTCAAATCTCATTACTGCATACGAGGACATACCCTA
 CGACCTAGACCTAGAGCTACCCTACGTGCAGGACTATTTATCCAATGT
 TGGGAGTTGAAATGCTCGTATGATAGACAGCTGAATGCGTTGCTAGGG
 CAGTACAGAGTAGAAAAAGAAGGTGAACTTGTTACGGGGTCATATTTG
 CTCAATGGCTTGGGCTACATACAACAGCAAAAAGCAAGGAGACGTТА
 AAGAGAGGGTGAAGCACGCGTACAAT

18s РНК:

CGGGGGAGAAGAGACGATATCCCCCCCCCGGGGGAGGGGCGCC
GCGCCCCCGCCCCCCCCAAAAGAGAGACAGACGACGACACAAAAAAT
CCCCCCCCCCTTTTTTTAAAAAACACACAAAAAATCATCCCCCCCCC
CCCCCCTCGGGGGGCCCCGTTTCTGTTCCCCAAAAAGTTCCCCCGTCC
TCAACCAGAAAAAACCTGGCATGCCTTTGGCCATGAAATTGACCAA
GCGAAATGACAAAATGTGGGAAAGATCGGTCCCTGTTGTATTGCTTTT
AATTACCAAGGCAACACAGGGATGTATAGGGTTAAACTTACAATTATC
GTTTAAATCAAAATCTCATCAACGAACACAAAAGGTTTTATTACCCT
TACCCATTGCAAACAATAATAAACAATCGAAATCGCCCTACCACATC
TTTCTTATTTTTCCCTAACTTTTCCTTTCACCTTCGCGCGCCCTTCCCCT
CCGTTCAAGGGA

Компьютерный анализ выявил заметный процент гомологии с представленными в базе данных NCBI; для нуклеотидных последовательностей RDR сходство составляло 67-73%, для 18s rRNA 73-74%.

«Поскольку, обнаруженные в растениях шалота нуклеотидные последовательности кодируют полипептиды, обладающие наиболее высоким уровнем гомологии (>98%) с RDR6 арабидопсиса и риса, можно полагать, что полученная в работе информация отражает ситуацию именно с этим классом РНК-полимераз.

Таким образом, впервые представлены доказательства экспрессии в растениях шалота нуклеотидных последовательностей, кодирующих растительную РНК зависимую полимеразу и 18s РНК» (Архипов, 2017).

Праймеры разработанные в ходе настоящей работы могут быть рекомендованы для дальнейших молекулярно-биологических исследований соответствующих последовательностей *Allium cepa var. aggregatum* G. Don.

«Исследование уровней представленности транскриптов кодирующих DCL-белки и RDR в листьях инфицированных растений, проводили в период, когда концентрация вируса достигала своего максимума (2-3 недели после высадки луковиц); в корнях этот параметр исследовали на 4-5 день после высадки луковиц (стадия ювенильных листьев) и затем - через 2 – 3 недели роста растений» (Архипов, 2017).

«Конструирование праймеров, использованных в настоящей работе при проведении полимеразной цепной реакции в реальном времени (Таблица 11) было осуществлено на основе установленных нами последовательностей кодирующих DCL, RDR и 18s РНК в *Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don., таким образом, что бы расчетный размер ампликона соответствовал оптимальному диапазону 100-200bp. Праймеры LTP pcr-59-F и LTP pcr-274-R были сконструированы непосредственно на основе известной последовательности, кодирующей неспецифический липидпереносящий пептид 4 шалота (AllTP4, GenBank Accession EF633511)» (Архипов, 2017).

Таблица 11. Структура праймеров, использованных при проведении полимеразной цепной реакции в реальном времени.

18S rRNA-F	CCC-GTT-TCT-GTT-CCC-CAA-AA
18S rRNA-R	AGA-AAG-ATG-TGG-TAG-GGC-GA
RDR-244-F	CCT-AGA-GCT-ACC-CTA-CGT-GC
RDR-450-R	ATT-GTA-CGC-GTG-CTT-CAC-C
DCL 3959-136-F	GTT-GAA-TTG-CCT-CCG-GAA-GTT-TGC
DCL 3959-293-R	TTT-TGC-ATG-CAG-TGA-TCC-GAA-TG
DCL 4834-298-F	GGA-GAGTTGGTTGATTCGTGGTCTTCG
DCL 4834-473-R	CCC-CGG-TCT-TCT-TCA-AGT-CA
DCL 5240-241-F	CAA-TCG-CAT-TTC-TTA-ACT-GGC-TTG-GAA-T
DCL 5240-414-R	AGG-CAT-GAA-GAA-GAA-GGC-CA
LTP pcr-59-F	GCA-GTC-CGT-ATG-CAA-AT
LTP pcr-274-R	TAG-GGT-TTC-GTC-TCA-GAC-CG

«Набор праймеров генерировали с помощью программы Primer3 v.4.1.0» (Архипов, 2017).

«Выбор оптимальных праймеров осуществляли методом полимеразной цепной реакции по конечной точке» (Архипов, 2017).

«Уровни представленности транскриптов, кодирующих белки-мишени в исследуемых образцах, определяли методом ПЦР в реальном времени; алгоритм delta-delta CT; калибратор – безвирусные сеянцы шалота; нормалайзер – 18S РНК» (Архипов, 2017).

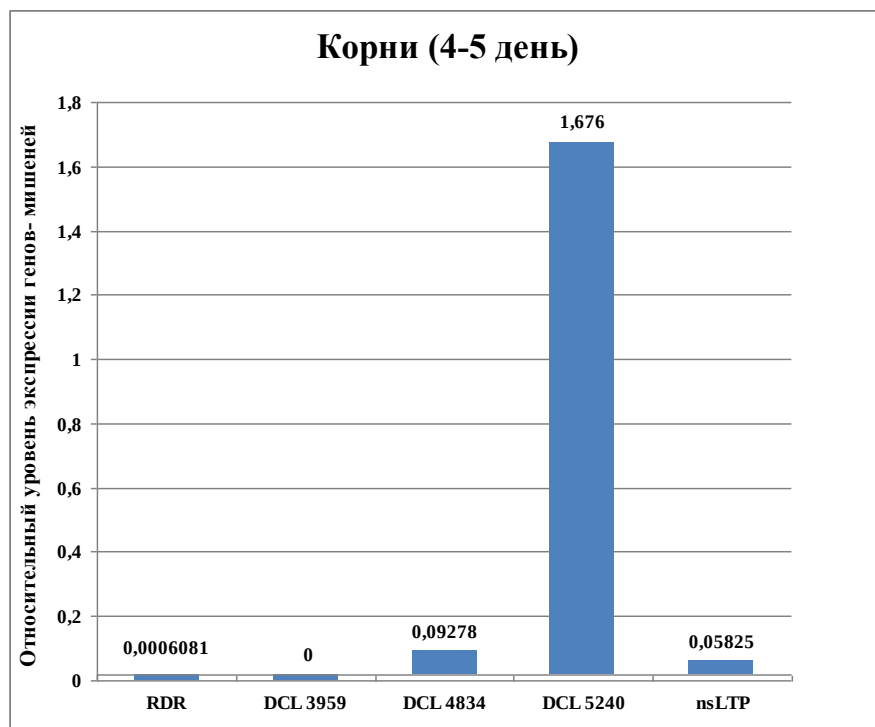
«Амплификатор – Lightcycler 96 («Roche Diagnostics GmbH», Германия), набор реагентов SYBR® Green Reagents (ОАО «Синтол», Москва)» (Архипов, 2017).

«Как следует из результатов, представленных на Рис.18, в корнях инфицированных растений шалота уже на 4 день после высадки луковиц (Рис.18, А) было выявлено значительное подавление экспрессии RDR и DCL, и через две недели роста растений экспрессия генов-мишеней оказывалась подавленной полностью (Рис.18, Б). В листьях максимальный уровень подавления экспрессии DCL – белков составлял 40- 60%, тогда как уровень экспрессии RDR снижался на 98% (Рис.18, В). Выявленные различия в уровнях представленности нуклеотидных последовательностей, кодирующих DCL, свидетельствуют в пользу предположения о том, что эти последовательности принадлежат DCL-белкам разных классов» (Архипов, 2017).

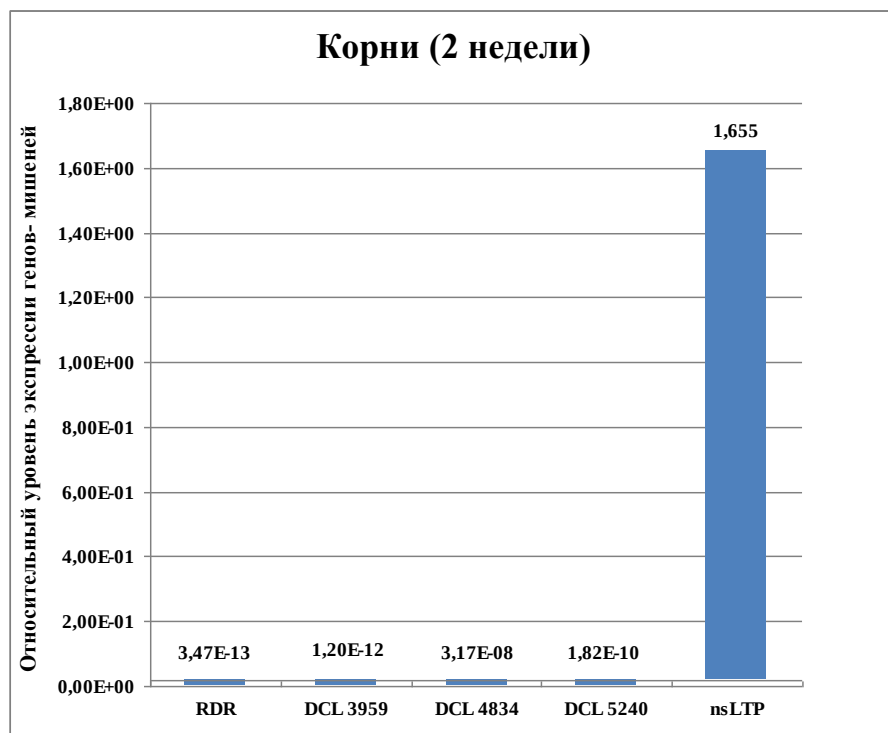
«Вирусная инфекция весьма специфичным и сложным образом модифицирует структуру транскриптома восприимчивых или резистентных к данному вирусному штамму видов растений-хозяев, при этом изменяется уровень экспрессии сотен генов, контролирующих как обуславливающие противовирусный иммунитет факторы, так и неспецифические факторы, в частности, липидпереносящие пептиды. Так в нашей работе отмечено, что

уровень экспрессии липидпереносящего пептида 4 в корнях и листьях двухнедельных инфицированных растений шалота, в отличие от RDR и DCL, заметно возрастал (Рис.18, Б и В)» (Архипов, 2017).

А.



Б.



В.

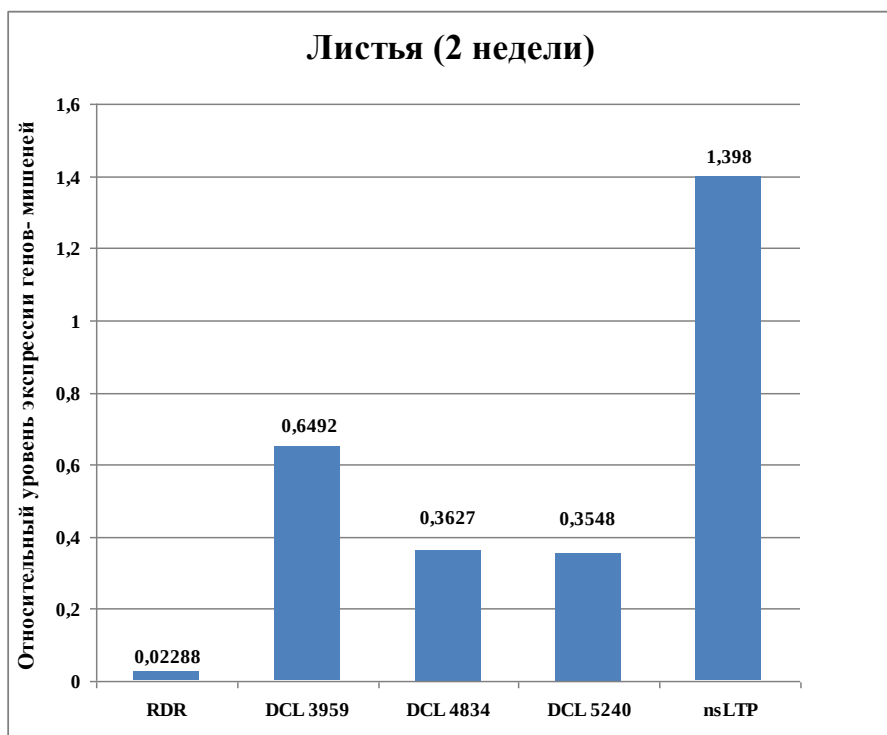


Рисунок 18. Относительные уровни экспрессии генов-мишеней в корнях (А, Б) и листьях (В) растений шалота в условиях персистентной инфекции ХВШ.

«В настоящей работе впервые описан феномен подавления транскрипции генов клеточной РНК-зависимой РНК-полимеразы и DCL-белков в корнях растений шалота в условиях персистентной инфекции ХВШ. Мы предполагаем, что способность вируса подавлять экспрессию ключевых факторов РНК-сайленсинга обеспечивает успешную репродукция и формирование персистентной инфекции ХВШ в отсутствии собственного активного белка-супрессора» (Архипов, 2017).

4. Транскрипционное репрограммирование в процессе персистентной инфекции ХВШ

«Полученные в настоящей работе результаты свидетельствовали, что Х вирус шалота успешно репродуцируется и формирует персистентную инфекцию в отсутствие активного белка-супрессора. При этом инфекция ХВШ, сопряжена с подавлением экспрессии по меньшей мере двух факторов сайленсинга (DCL-белков и RDR) в корнях и листьях инфицированных растений, и влияет на неспецифические факторы антивирусного иммунитета, в частности липид-переносающий белок» (Архипов, 2019).

«Мы предположили, что механизмом позволяющим ХВШ преодолевать иммунный барьер может быть обусловленное РТІ (Pattern-triggered immunity) специфическое транскрипционное репрограммирование, в результате которого могут избирательно изменяться уровни экспрессии значительного ряда генов, кодирующих факторы антивирусного фитоиммунитета» (Архипов, 2019).

«Представленные в последние время экспериментальные данные, свидетельствуют о том, что фитовирусы (подобно бактериальным патогенам) индуцируют процесс, аналогичный классическому РТІ, индукторами которого (вирусными PAMPs) могут служить двуцепочечные репликативные формы вирусных РНК (Korner C.J., et. all., 2013, Niehl A., et. all., 2016, Mitter N., et. all., 2017)» (Архипов, 2019).

Экспериментальная проверка гипотезы о возможной роли транскрипционного репрограммирования в репродукции ХВШ предполагала анализ сравнительной экспрессии ряда генов, задействованных в процессах РТІ и антивирусного растительного иммунитета.

В таблицах приведены маркеры РТІ (табл. 12) и соответствующие праймеры (табл. 13,14).

Таблица 12. Гены-мишени, уровни экспрессии которых исследовали в настоящей работе в условиях персистентной инфекции шалота (*Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don) X вирусом шалота.

Символ гена.	Название белка – продукта экспрессии.	Вид растения, ортолога*.	ID ортолога*.
Гены-маркеры РТИ			
ARM	Armadillo repeat family proteins	Arabidopsis thaliana	AT3G02840
RBOHD	Respiratory Burst Oxidase Homologue D	Arabidopsis thaliana	AT5G47910
EDS5	Mate Efflux Family Protein (Enhanced Disease Susceptibility 5)	Arabidopsis thaliana	AT4G39030
LOX3	Lipoxygenase 3	Arabidopsis thaliana	AT1G17420
BRI1	Bri1-like 3 (Brassinosteroid insensitive)	Arabidopsis thaliana	AT3G13380
SOBIR	Leucine-Rich Repeat Protein Kinase Family Proteins (Suppressor of Bir1-1/Evershed)	Arabidopsis thaliana	AT2G31880
CRK4	Calcium-dependent protein kinase (CDPK) family proteins (Cysteine-rich receptor-like kinase 4)	Arabidopsis thaliana	AT5G24430
SERK1	Somatic embryogenesis receptor-like kinase 1	Arabidopsis thaliana	AT1G71830
PR1	Pathogenesis-related proteins group 1	Arabidopsis thaliana	AT2G14610
PR5	Pathogenesis-related proteins group 5	Arabidopsis thaliana	AT1G75040
NHL10	Late embryogenesis abundant (lea) hydroxyproline-rich glycoprotein family	Arabidopsis thaliana	NP_181142.1
ACRE31	Avr9/cf-9 rapidly elicited protein 31	Nicotiana tabacum	AAG43547.1
ACRE132	Avr9/cf-9 rapidly elicited protein 132	Nicotiana tabacum	AF211532.1
Другие гены-мишени.			
DCL	Dicer-Like proteins	Allium sativum	EPP005KGAA12 S003959
RDR 6	RNA-dependent RNA polymerase 6	Arabidopsis thaliana	NP_001327617.1
AGO	Argonaute family proteins	Triticum aestivum	AGB34311.1
Tm22	ToMV resistance protein	Solanum lycopersicum	AAQ10736.1
PR6	Pathogenesis-related proteins group 6	Arabidopsis thaliana	NP_199170.2
LTP	Lipid transfer proteins (Pathogenesis-related proteins group 14), (Antimicrobial protein Ace-amp1 precursor mRNA)	Allium cepa	AF004946.1
WRKY	WRKY transcription factors family proteins	Arabidopsis thaliana	AEC09374.1
TCTP	Translationally controlled tumor proteins	Jatropha curcas	EF091818.1
PIRL	Plant intracellular Ras group-related LRR proteins	Arabidopsis thaliana	NP_196204.1
DBP1	DNA-binding protein phosphatase 1	Arabidopsis thaliana	NP_001324148.1
CBP60g	CBP60G (Calmodulin-binding protein 60 G)	Arabidopsis thaliana	OAO89604.1
GRF6	G-box regulating factor 6	Arabidopsis thaliana	NP_001190276
FRK1	FRK (Fertilization-related kinase 1)	Arabidopsis thaliana	OAP09570.1

*Указаны ортологи, с помощью которых были получены оптимальные результаты при конструировании соответствующих праймеров (см. табл. 13, 14).

Таблица 13. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных при определении уровней экспрессии маркеров РТІ при персистентной инфекции шалота X вирусом шалота (ПЦР в реальном времени).

Праймер.	Последовательность.	ID транскрипта <i>Allium cepa</i> L. в базе данных TSA (NCBI).
ARM 530-L	5'- ATGATGCGGGCCTAGTAGAC -3'	GETF01031504.1
ARM 766-R	5'- CTCCCTCGATCAGTCCACTC -3'	
RBOHD 2641-L	5'- GTTTGATCCTAGACGACGCG -3'	GBRN01002659.1
RBOHD 2868-R	5'- TCAACATACCCGACCCGAAA -3'	
EDS5 303-L	5'- TCGCTTGGTCTTGGCTTCTA -3'	GBRQ01023449.1
EDS5 549-R	5'- CGTCTGAGAATCCAACGACG -3'	
LOX3 1753-L	5'- ATGCCACTCGTACGCTTTTC -3'	GBRQ01024907.1
LOX3 1943-R	5'- GACGCCTGCATCATTAGAGC -3'	
BRI1 1541-L	5'- TGTTCCCGCTCAGCTGATTA -3'	GBRQ01031765.1
BRI1 1749-R	5'- TACTTTCGGTGGCAATGGGA -3'	
SOBIR 812-L	5'- CAAGTCATGCAAGCTTCCGT -3'	GBRQ01012958.1
SOBIR 1041-R	5'- CTGGAAAGATGATCGCGGTG -3'	
AtCRK4 1496-L	5'- CTTTCTTGACCTTGGCCTCG -3'	GBGJ01061169.1
AtCRK4 1731-R	5'- TCCCCAGCTAAGCACATCAA -3'	
SERK1 1291-L	5'- CTTCTTCAGCGGGAACATCG -3'	GBGJ01064935.1
SERK1 1478-R	5'- TCCACCTCCTCCATTTGTCC -3'	
PR1 443-L	5'- GTCAAGATCGGTTGCGCTAG -3'	GBJZ01171295.1
PR1 660-R	5'- CCAAGCAAACCTCTCATCGCA -3'	
PR5 616-L	5'- ACTGTCTACGGGCCCAAAAT -3'	GBGJ01079964.1
PR5 803-R	5'- ATATGCTGCCTCCGGAACCTC -3'	
18S rRNA-L*	5'- CATCAGCTCGCGTTGACTAC -3'	
18S rRNA-R	5'- GATCCTTCCGCAGGTTTAC -3'	

* 18S rRNA праймеры представлены в научных литературных источниках (Gaspar et al., 2004; Baier T., 2018; Abdelkhalek A., 2022).

Таблица 14. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных при определении уровней экспрессии факторов РНК-сайленсинга, NB-LRR рецепторов и генов, принимающих участие в репродукции фитовирусов, при персистентной инфекции шалота X вирусом шалота (ПЦР в реальном времени).

Праймер.	Последовательность.	ID транскрипта Allium cepa L. в базе данных TSA (NCBI).
Ago-L-672	5'-AACTCCCAAGAAGCTTTGCG-3'	GBGJ01050630.1
Ago-R-851	5'-CCCTCCTTGAGCAGTTCTGA-3'	
Tm22-L-3013	5'- TCGTGGGCTCTTTCAGTATG-3'	GBRN01023560
Tm22-R-3257	5'- CACCCGCTTCATTGGTGTAG-3'	
FRK1-L-421	5'-AGTCACGCTCAATGGCAATG-3'	GAAO01012059.1
FRK1-R-635	5'-CTGCCGCAACATCATAGCAT-3'	
NHL10-L-327	5'-TGCTCCTCACATCGTTCACA-3'	GBRQ01023138.1
NHL10-R-572	5'-AGCTCACCACCTTCACTCTC-3'	
ACRE31-L-473	5'-GCAGTCTTTCGAAAGCAGGA-3'	GBRO01073928.1
ACRE31-R-699	5'-ATTGAGCACATCCTCCCCCTT-3'	
ACRE132-L-272	5'-GCCATGCCTCAACCTGATTT-3'	GBRQ01011764.1
ACRE132-R-451	5'-CCTTCTTGATCGGGAAAGCG-3'	
PR6-L-100	5'-ATGAGGGGTACATGGCAGAC-3'	GBRQ01165078.1
PR6-R-274	5'-AAGCATCGGAAGCGAAGAAG-3'	
LTP pcr-59- L	5'-GCAGTCCGTATGCAAAT-3'	AF004946.1
LTP pcr-274-R	5'-TAGGGTTTCGTCTCAGACCG-3'	
WRKY-L-1367	5'-ACGTGGAAAGGGCATCAAAC-3'	GBRO01047677.1
WRKY-R-1550	5'-GCGACCGGTCTTTGAACATT-3'	
TCTP-L-172	5'-AGGGCAAGTGGGTAGTTCAA-3'	JR844934.1
TCTP-R-382	5'-TCCAATTTCTGAAGGCAGAAGT-3'	
PIRL-L-84	5'-ATCATGGATCCAAGCCCCAA-3'	GAAN01019083
PIRL-R-377	5'-CTTTGCGAGGTCAACAGCTT-3'	
DBP-L-392	5'-AGGGTCGTTGTGCTCTTGTA-3'	GBRO01024689.1
DBP-R-623	5'-CAACGGTCAGCTCAACGTAG-3'	
CBP-L-429	5'- GAAGCAGAGGGAAAGCAACC-3'	GBRO01059419.1
CBP-R-673	5'- AAGCCAACACCATCATGCAG-3'	
GRF6-L-607	5'-TCCAGTCTTGAATTCGGCCA-3'	GAAN01023832.1
GRF6-R-829	5'-TTCGATCGAGCAGAAGGAGG-3'	

«Образцы проростков и листьев растений шалота (*Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don) размноженных в условиях персистентной инфекции ХВШ отбирали через 3 суток и через 2 недели после высадки луковиц» (Архипов, 2018).

«Поиск нуклеотидных последовательностей, кодирующих гомологи выбранных генов-мишеней, в транскриптоме наиболее близкого к шалоту вида *A. cepa* L. проводили с использованием программы tblastn и базы данных TSA (Transcriptome Shotgun Assembly, NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/tsa/>)» (Архипов, 2018).

«Соответствие обнаруженных транскриптов искомым белкам-гомологам устанавливали с помощью программы blastx» (Архипов, 2018).

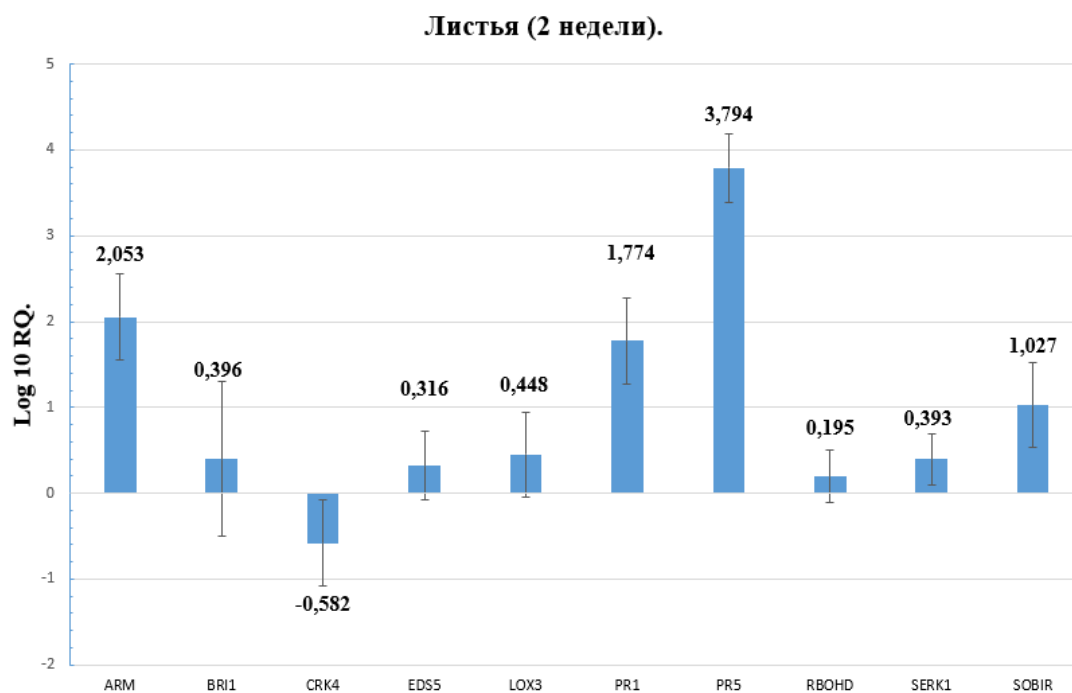
«Набор праймеров, специфичных в отношении шалотных гомологов исследуемых генов-мишеней генерировали с помощью программы Primer3 v.4.1.0. Выбор оптимальных праймеров осуществляли методом полимеразной цепной реакции по конечной точке» (Архипов, 2018).

«Уровни представленности транскриптов, кодирующих белки-мишени в исследуемых образцах, определяли методом ПЦР в реальном времени; алгоритм delta-delta CT; калибратор – безвирусные сеянцы шалота; нормалайзер – 18S РНК, что в условиях наблюдаемого динамического процесса транскрипционного репрограммирования представляется оптимальным выбором» (Архипов, 2018).

«Амплификатор – 7500/7500 Fast Real-Time PCR Systems или QuantStudio («Applied Biosystems», США), набор реагентов SYBR® Green Reagents (ОАО «Синтол», Москва)» (Архипов, 2018).

Результаты представлены на рисунках 19-21.

А.



Б.

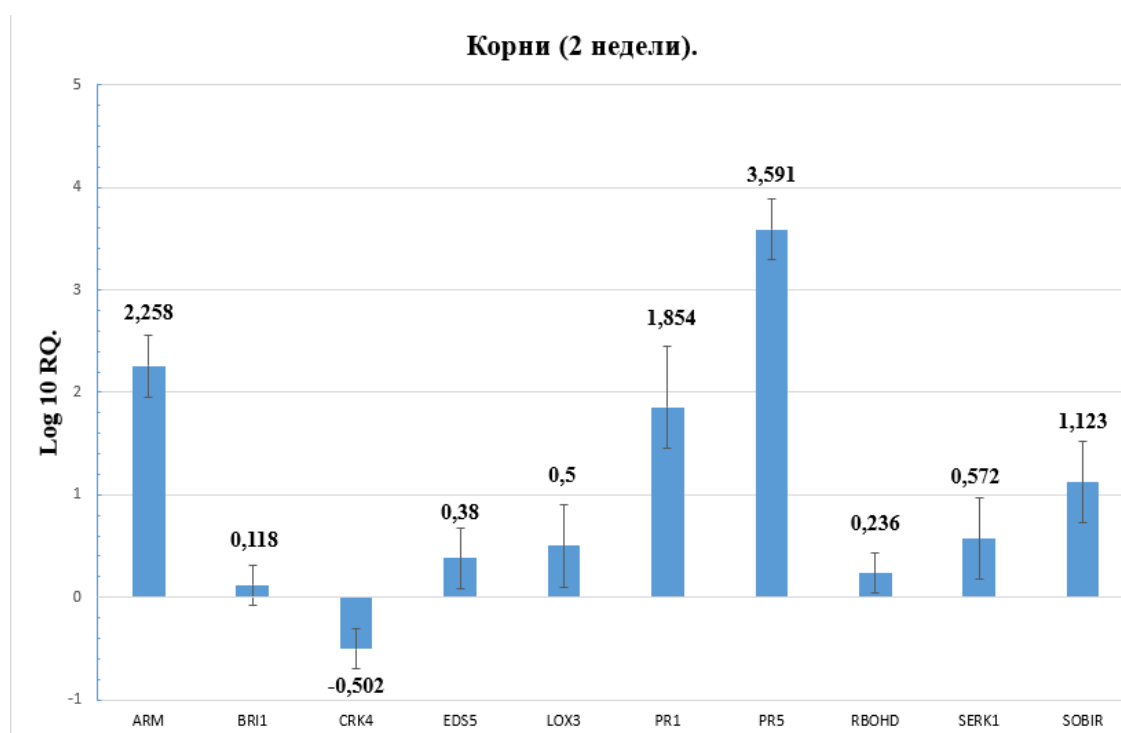
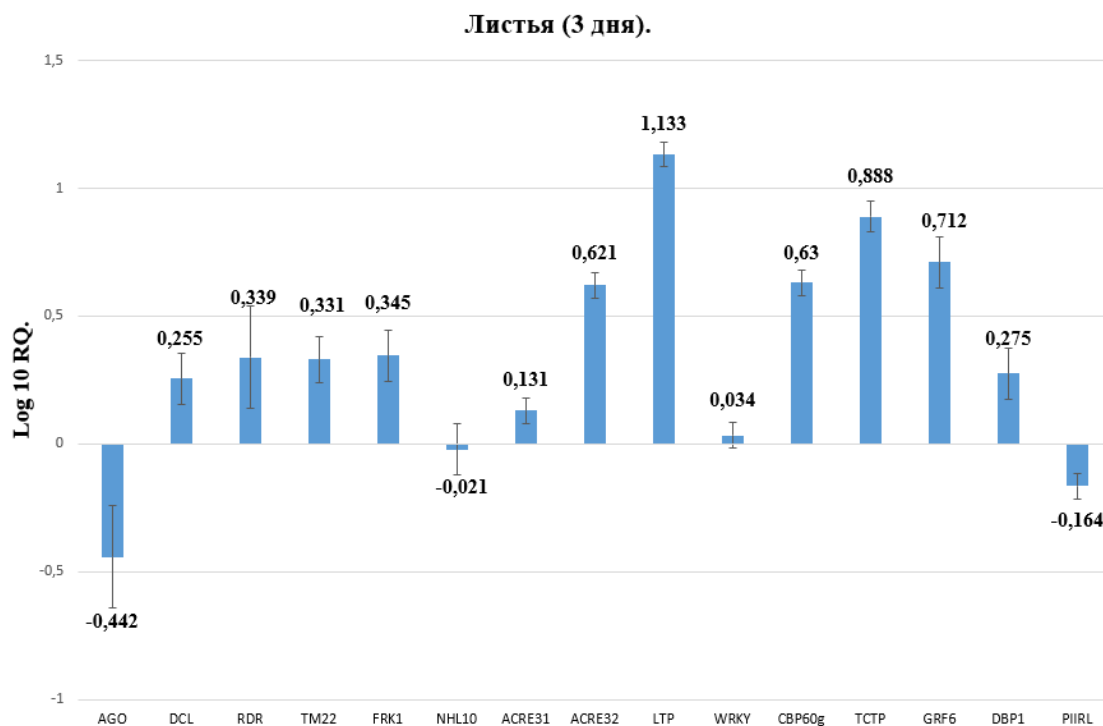


Рис. 19. «Представленность транскриптов генов-маркеров Pattern-Triggered Immunity (PTI) в листьях (А) и в корнях (Б) растений шалота (*Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don) при персистентной инфекции X вирусом шалота через 2 недели после высадки луковиц: RQ — Relative Quantification (изменения в экспрессии мРНК относительно величины для РНК внутреннего контроля)» (Архипов, 2018).

А.



Б.

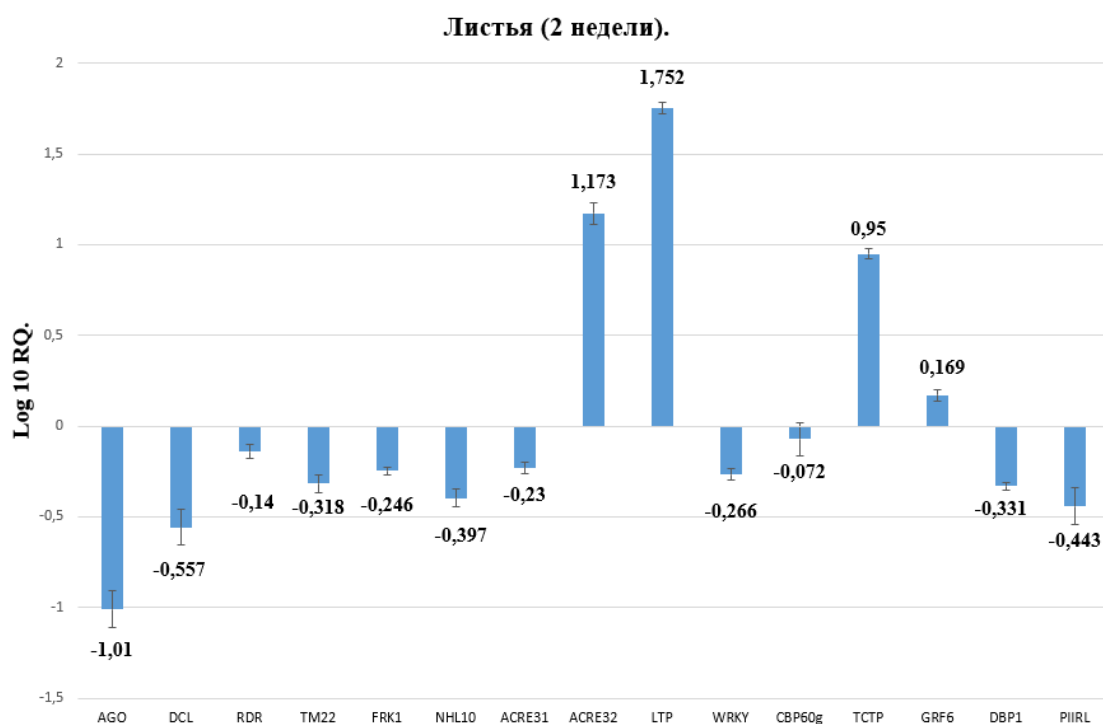
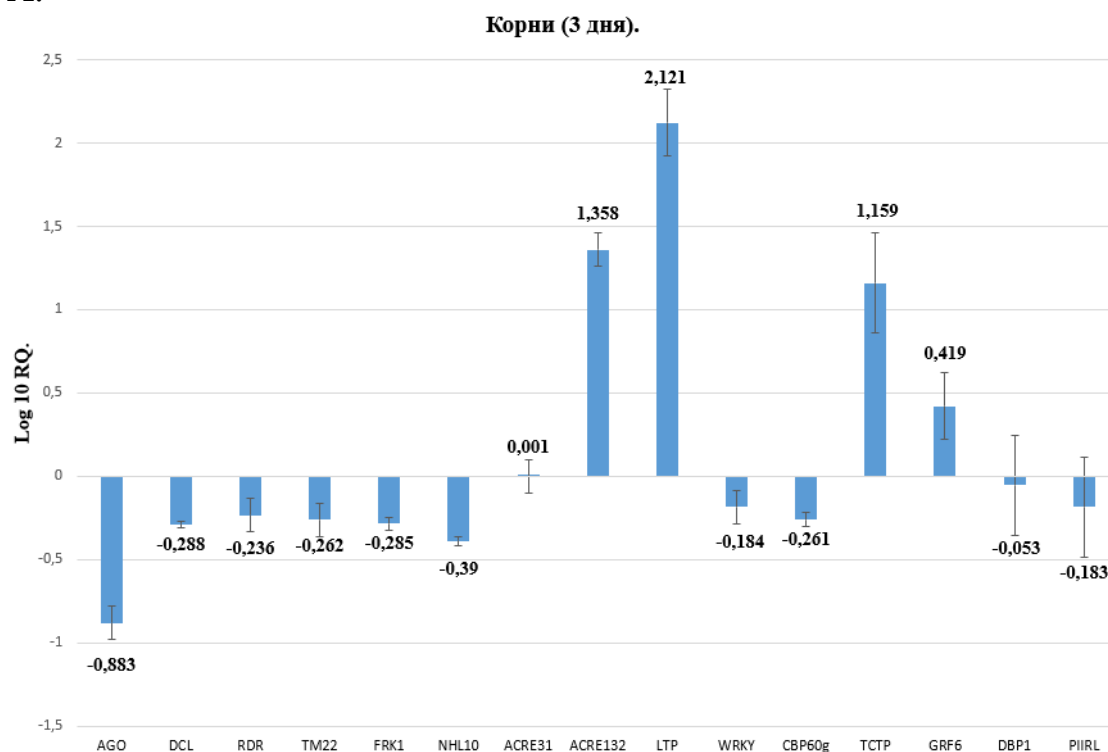


Рис.

Рис. 20. «Представленность транскриптов генов-мишеней факторов фитоиммунитета в надземных органах растений шалота (*Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don) на разных стадиях инфекции X вирусом шалота: А — проростки (3 суток после высадки луковиц), Б — листья (2 недели после высадки луковиц); RQ — Relative Quantification (изменения в экспрессии мРНК относительно величины для РНК внутреннего контроля)» (Архипов, 2018).

А.



Б.

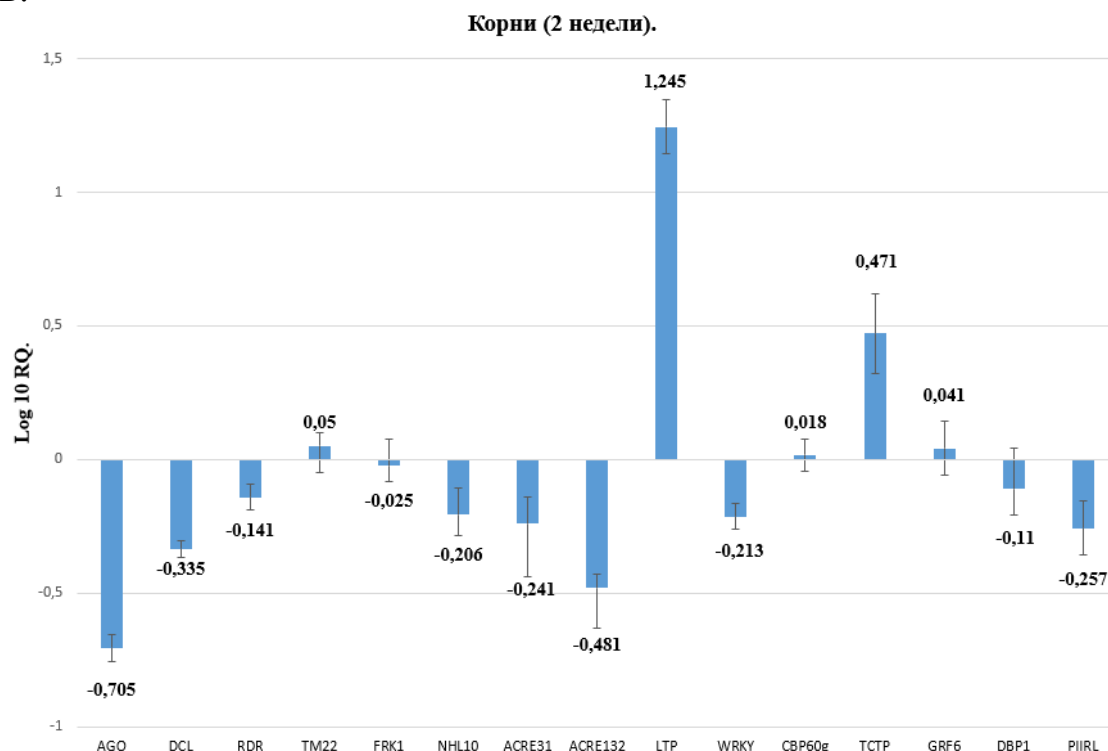


Рис. 21. «Представленность транскриптов генов-мишеней факторов фитоиммунитета в корнях растений шалота (*Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don) на разных стадиях инфекции X вирусом шалота: А - 3 суток после высадки луковиц, Б - 2 недели после высадки луковиц; RQ - Relative Quantification (изменения в экспрессии мРНК относительно величины для РНК внутреннего контроля)» (Архипов, 2018).

«Как следует из полученных результатов (см. рис. 19), в той или иной мере вирусная инфекция влияет на экспрессию всех исследованных генов, однако при этом выявляется группа генов с очень высокой экспрессией и в листьях, и в корнях инфицированных растений (SOBIR, ARM, PR1, PR5). Следовательно, можно сделать вывод, что ХВШ в период инициирования инфекции взаимодействует с компонентами механизма РТІ и в результате индукции РТІ запускается процесс транскрипционного репрограммирования» (Архипов, 2018).

«На начальной стадии инфекционного процесса в проростках (рис. 20, А) активировалась экспрессия всех генов-мишеней (табл. 12), за исключением AGO и PIRL» (Архипов, 2018).

«Через 2 недели инфекции ситуация в целом изменялась на противоположную (рис. 20, Б): в листьях подавлялась экспрессия большинства генов-мишеней, в том числе всех факторов РНК-сайленсинга (более других — белков-аргонавтов), трех маркеров РТІ, NB-LRR рецепторов и белков СБР60g, контролирующих синтез салициловой кислоты» (Архипов, 2018). «На достаточно высоком уровне поддерживалась экспрессия только ACRE132 (маркера РТІ), липид-трансферных белков и комплекса TCTP+GRF6» (Архипов, 2018).

«В корнях (рис. 21, А, Б) ингибирование экспрессии генов-мишеней отмечали уже на начальной стадии инфекционного процесса, а через 2 недели подавленной оказывается уже большая часть генов-мишеней, при этом экспрессия LTP снижалась незначительно» (Архипов, 2018).

«Из представленных результатов следует, что в условиях персистентной инфекции ХВШ индуцирует в корнях и листьях растений избирательное изменение экспрессии ряда генов-мишеней, включая гены кодирующие белки-маркеры РТІ, факторы РНК-сайленсинга, NB-LRR рецепторы, липид-трансферные белки, а также белки, принимающие участие в репликации вируса (ТСТР-комплекс), то есть ХВШ инициирует динамический процесс транскрипционного репрограммирования» (Архипов, 2019).

«Проведенное исследование так же показало, что уровень экспрессии гена ARM в исследуемой патосистеме был существенно выше, нежели в безвирусных растениях» (Архипов, 2019).

«Данный ген кодирует белок, принимающий участие в процессах антивирусной ксенофагии и РНК-распада (RNA-decay), что позволило нам предположить индуцирование персистентной вирусной инфекцией процессов аутофагии и изменений транскрипционных программ экспрессии ряда факторов контроля качества РНК (RQC, RNA Quality Control)» (Архипов, 2019).

«Процессы аутофагии, включая прямое связывание вирионов и/или их компонентов, внутриклеточный транспорт этих комплексов и их деградация в лизосомах, играют первостепенную роль в развитии антивирусного иммунного ответа в животных системах. В то же время факторы аутофагии, участвующие в антивирусном иммунитете растений, изучены совершенно недостаточно» (Архипов, 2019).

«С другой стороны, в растениях РНК-сайленсинг и RNA-decay являются ключевыми процессами, осуществляющими количественный и качественный контроль пула клеточных информационных РНК. Возникновение структурно или функционально дефектных молекул мРНК индуцирует процесс посттранскрипционного РНК-сайленсинга, в то же

время подобные молекулы распознаются и уничтожаются при участии сложного комплекса механизмов RQC» (Архипов, 2019).

«Поскольку вирусные РНК обладают рядом необычных, с точки зрения клетки, структурных особенностей, эти молекулы также атакуются механизмами RNA-decay, представляющими, таким образом мощный фактор антивирусного иммунитета» (Архипов, 2019).

«В данной части работы мы исследовали изменения транскрипционных программ экспрессии ключевых факторов аутофагии и RQC в условиях персистентной инфекции ХВШ» (Архипов, 2019).

«В таблице 15 представлены гены-мишени и соответствующие им белки-факторы аутофагии, в таблице 16 – гены-мишени, кодирующие факторы RQC» (Архипов, 2019).

Таблица 15. Факторы аутофагии и праймеры для их детекции в растениях шалота методом ПЦР в реальном времени.

Гены-мишени	Кодируемый белок	ID транскрипта А. сера TSA NCBI	Праймеры	Структура праймеров
VPS15	Vacuolar protein sorting-associated protein 15	Не выявлены		
ATG 2	Autophagy related protein 2	GBJZ01171052.1	ATG 2-L-5941 ATG 2-R-6167	5'-CTGACGACAACCTGTTACCG-3' 5'-GAACGTGGAAATCGGGGAAG-3'
ATG 3	Autophagy related protein 3	GFAK01032324.1	ATG 3-L-168 ATG 3-R-416	5'-TGGAAAGAATGACTGGGCCT-3' 5'-TTTCTCCTCCTGCAGCTTCA-3'
ATG 4	Autophagy related protein 4	GBRQ01109808.1	ATG 4-L-617 ATG 4-R-814	5'-GTGATGTTGGATGGGGATGC-3' 5'-GTTGCCCCAGCTTGTACCAAA-3'
ATG 5	Autophagy related protein 5	GBRN01043093.1	ATG 5-L-104 ATG 5-R-315	5'-CACTACTCTTCTCCTCCGC-3' 5'-AGGGTCTTTCAGGTTCTGCA-3'
ATG 6	Autophagy related protein 6 (Beclin1)	GETF01033334.1	ATG 6-L-324 ATG 6-R-481	5'-CGTGTACCTCATGACGCTG-3' 5'-CCTGTGTTTGGGAGGTAGCT-3'
ATG 8a	Autophagy related protein 8a	GETF01010403.1	ATG 8a-L-116 ATG 8a-R-279	5'-GGAGCGACATACCTGACATTG-3' 5'-AGACATCATGGCAGCTGTTG-3'
ATG 9	Autophagy related protein 9	GBRO01033586.1	ATG 9-L-2592 ATG 9-R-2820	5'-CTTCCTCTTTTGGGCAGCAG-3' 5'-AATAGCCCACTCCCTTGACC-3'
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase	GETF01037631.1	PI3K -L-2105 PI3K -R-2272	5'-CAAAACCCCTTCCACCACCC-3' 5'-AGCCCGCCATCAAAGAAAAG-3'
UBQ11	Убиквитин	JR850432.1	UBQ11-L-290 UBQ11-R-545	5'-TACTGCAACCACCACGAAGA-3' 5'-GTTCTGAGGCTTAGGGGAGG-3'
NBR1	Карго-рецептор в селективной аутофагии	GBRN01003325.1	NBR1-L-2239 NBR1-R-2430	5'-TTCAGATGCGCTTCCTAACA-3' 5'-AGAGGGTCCCATTGAGCAAA-3'
TRIM41	tripartite motif-binding protein 41	GBRN01073137.1	TRIM41-L-591 TRIM41-R-807	5'-TGCAGCTCAAACACAAACGA-3' 5'-ACTCCCACTTTCATTGCTTTGT-3'
TRIM5α	tripartite motif-binding protein 5α	GBGJ01000326.1	TRIM5α -L-222 TRIM5α -R-376	5'-GTTTGACCTTTGCTTGCCCT-3' 5'-TTTTGTACGACAGTTGGGGC-3'
MAPK	stress-activated mitogen-activated protein kinase	GETF01030019.1	MAPK -L-710 MAPK -R-946	5'-CGGCAATTGATGTCTGGTCA-3' 5'-TAGCTGCTGGTTGGACATGA-3'

Таблица 16. Факторы RQC и праймеры для их детекции в растениях шалота методом ПЦР в реальном времени.

Ген	Функция кодируемого белка	ID транскриптов А. сера TSA NCBI	Праймер	Последовательность
RRP41	3'-5'-exoribonuclease. Involved in 3'-5'-exoribonuclease activity, RNA binding; RNA processing	GAAN01015296.1	RRP41-L-222	5'-CACTGCAGTTCCCACATCAC-3'
			RRP41-R-413	5'-CCTAAGAAAAGCCGGTCTGC-3'
RRP42	exosome complex RNA-binding protein	GAAO01016674.1	RRP42-L-336	5'-GAGCTCTCTTCATCCCGACA-3'
RRP43	exosome non-catalytic core subunit. Involved in 3'-5' RNA processing and degradation in both the nucleus and the cytoplasm.	GAAN01010365.1	RRP42-R-509	5'-GAAAGATCAAGCCCAGCACC-3'
			RRP43-L-976	5'-GCTCATAAAAGGGAAGCGGG-3'
RRP40	Ribosomal RNA processing Exosome complex exonuclease. The exosome plays a central role in 3' to 5' RNA processing and degradation.	GETF01022424.1	RRP43-R-1184	5'-CATCATCGGCTCATCCTTGC-3'
			RRP40-L-315	5'-GCCCGTACTTGCATTGAAG-3'
RRP6	exosome complex exonuclease	GFAK01071797.1	RRP40-R-542	5'-ACTGGACATGTTGGTGAGCT-3'
			RRP6-L-50	5'-GAAAGCTCGATCTCATGGCG-3'
CSL4	complex RNA-binding protein	GBRQ01072570.1	RRP6-R-235	5'-TCCGACAAAAGATCCATGCCT-3'
			CSL4-L-740	5'-CTTTGCCAGCGATGATTTGC-3'
DCP1	mRNA decapping protein	GAAN01021809.1	CSL4-R-969	5'-TCGCTCTCTGTTGGACCAAT-3'
			DCP1-L-713	5'-ACCAGCACCTTCTTACCCAA-3'
DCP2	mRNA decapping protein	GETF01027086	DCP1-R-867	5'-TAACAAGGTTTCGTCGATGG-3'
			DCP2-L-741	5'-CCATCCTCCTCCAGTAGCTC-3'
SGS3	Suppressor of gene silencing 3 Including: XS zinc finger domain; XS domain; TATA Binding Protein (TBP) Associated Factor 12 (TAF12) is one of several TAFs that bind TBP and is involved in forming Transcription Factor IID (TFIID) complex Required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance	GETF01032354.1	DCP2-R-970	5'-AGTTGGCAGCAAAAGCAGTT-3'
			SGS3-L-241	5'-ACAAGGGGAACACGAAGAGT-3'
XRN3	5'-3' exoribonuclease 3. XRN3 acts as a suppressor of posttranscriptional gene silencing/ Involved in mRNA processing; miRNA catabolic process; negative regulation of posttranscriptional gene silencing; nuclear polyadenylation-dependent rRNA catabolic process; rRNA 5'-end processing.	GFAK01072575.1	SGS3-R-414	5'-AACCATCACCATAGGAGGCC-3'
			XRN3-L-3050	5'-CTGTAGCTGGGCCGTATGTA-3'
XRN4	5'-3' exoribonuclease 4. Involved in the ethylene response. Endogenous suppressor of posttranscriptional gene silencing.	GBRN01015228.1	XRN3-R-3249	5'-GCCACGATTTGATCCACCTC-3'
			XRN4-L-2182	5'-TCCTCGCCGTCATCAACATA-3'
UPF1	Regulator of nonsense transcripts	GBRQ01034547.1	XRN4-R-2367	5'-TGTGATGCTTCGCCTAGGAT-3'
			UPF1-L-308	5'-ATTTCCCACCCTTTCCAGT-3'
			UPF1-R-510	5'-ACTCAGATCCATCGTCCGTC-3'

«Образцы проростков и листьев растений шалота (*Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don) размноженных в условиях персистентной инфекции ХВШ отбирали через 5, 15, 25, 35 и 50 дней после высадки луковиц» (Архипов, 2019).

«Поиск нуклеотидных последовательностей, кодирующих гомологи выбранных генов-мишеней, в транскриптоме наиболее близкого к шалоту вида *A. cepa* L. проводили с использованием программы tblastn и базы данных TSA (Transcriptome Shotgun Assembly, NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/tsa/>)» (Архипов, 2019).

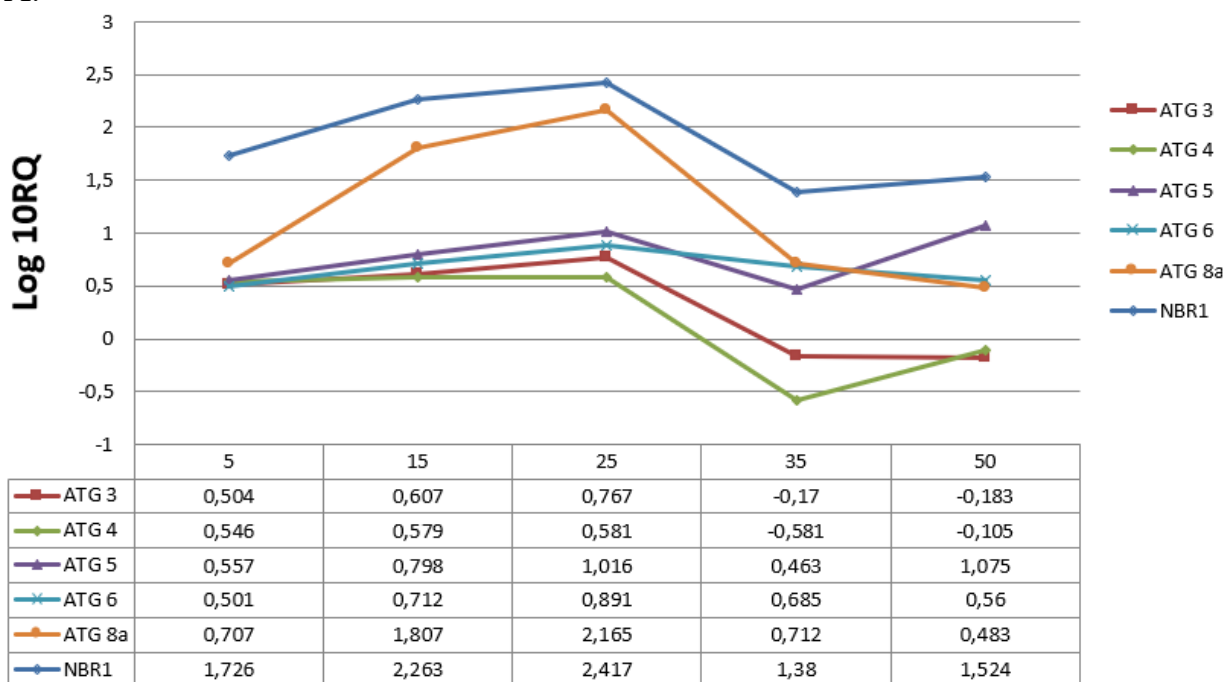
«Соответствие обнаруженных транскриптов искомым белкам-гомологам устанавливали с помощью программы blastx» (Архипов, 2019).

«Набор праймеров, специфичных в отношении шалотных гомологов исследуемых генов-мишеней генерировали с помощью программы Primer3 v.4.1.0. Выбор оптимальных праймеров осуществляли методом полимеразной цепной реакции по конечной точке» (Архипов, 2019).

«Уровни представленности транскриптов, кодирующих белки-мишени в исследуемых образцах, определяли методом ПЦР в реальном времени; алгоритм delta-delta CT; калибратор — безвирусные сеянцы шалота; нормалайзер — 18S РНК» (Архипов, 2019).

На рисунке 22 представлены — относительные уровни экспрессии факторов аутофагии, на рисунке 23 — относительные уровни экспрессии факторов RQC в листьях инфицированных растений шалота.

А.



Б.

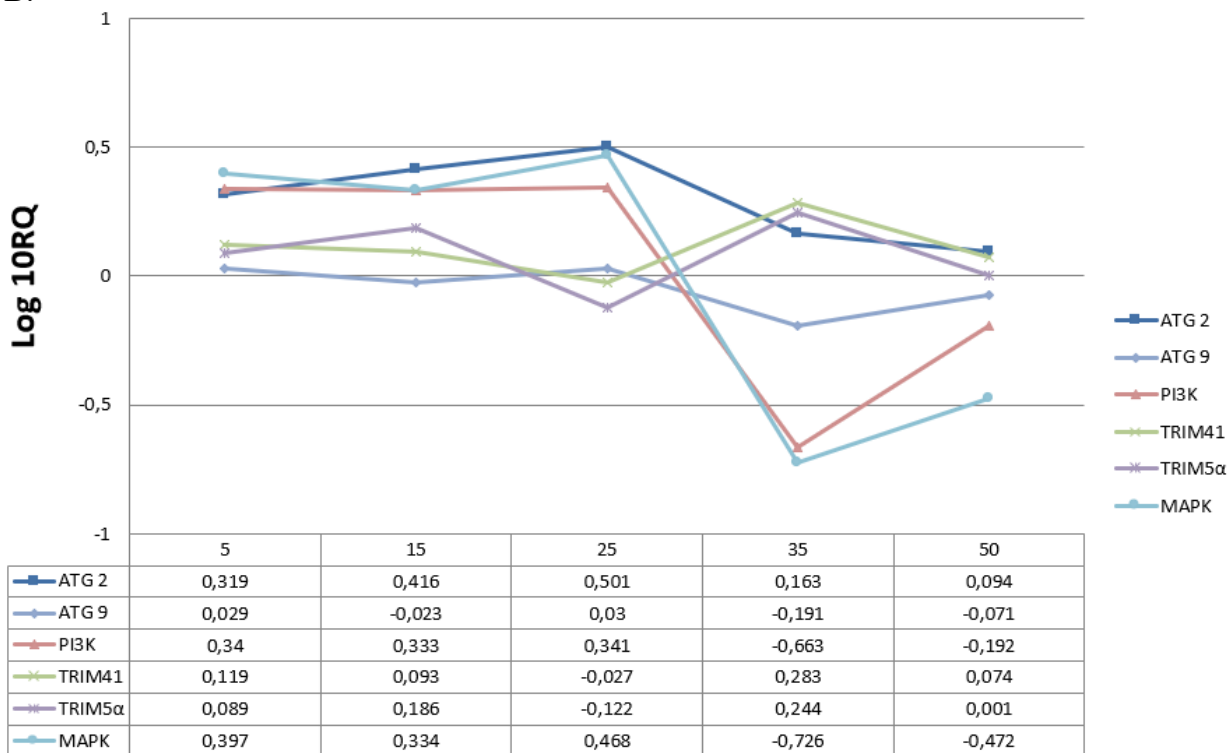
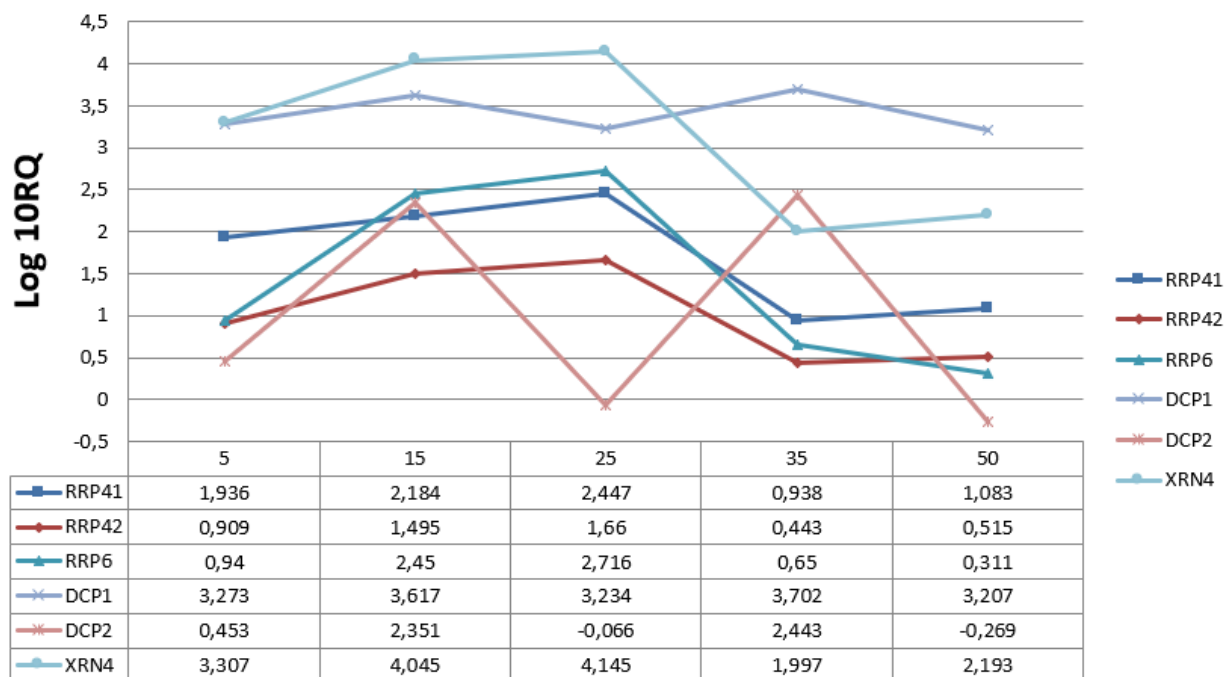


Рис. 22. «Относительные уровни экспрессии факторов аутофагии в листьях растений шалота инфицированных ХВШ: А – NBR1, ATG 3-6, 8a; Б – ATG2 & 9, PI3K, TRIM41 & 5alpha, MAPK. На оси абсцисс указаны дни после высадки луковиц. RQ: Relative Quantity» (Архипов, 2019).

А.



Б.

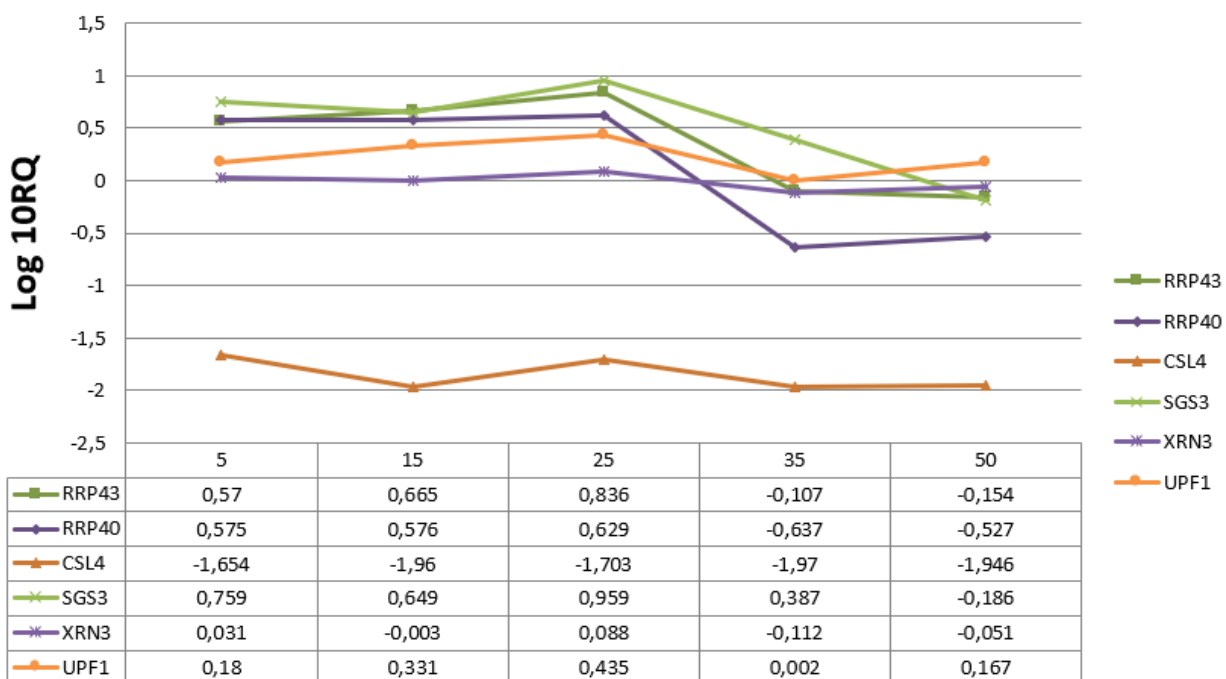


Рис. 23. «Относительные уровни экспрессии факторов RQC в листьях инфицированных растений шалота: А – RRP 6, 41, 42, DCP 1 & 2, XRN4; Б – RRP 40 & 43, CSL4, SGS3, XRN3, UPF1. На оси абсцисс указаны дни после высадки луковиц. RQ: Ralative Quantity» (Архипов, 2019).

«Наиболее выраженным результатом изменения транскрипционных программ экспрессии факторов аутофагии в исследуемой системе является существенное увеличение экспрессии Atg8a и NBR1 – ключевых факторов формирования аутофагосом» (Архипов, 2019).

«Также наблюдается существенное увеличение уровней экспрессии декэпирующего фактора DCP1 и XRN4 (5'-3' – экзорибонуклеазы) фактора, принимающего участие в реализации механизмов RNA-decay» (Архипов, 2019).

«XRN4 представляет собой мощный эндогенный супрессор РНК-сайленсинга, при этом экспрессия классического эндогенного супрессора сайленсинга – SGS3, после незначительного повышения, существенно подавляется. Одновременно наблюдается резкое подавление экспрессии CSL4 – 3'-5' – экзорибонуклеазы, в цитоплазме этот фактор участвует в процессе специфической деградации молекул мРНК, содержащих AREs (AU-rich elements) в составе 3'-нетранслируемой последовательности» (Архипов, 2019).

«Уровень экспрессии UPF-1-РНК-хеликазный комплекса (UPF-1 интерактом) участвующего в реализации одного из механизмов RQC, а именно нонсенс-опосредованного распада РНК (nonsense-mediated decay (NMD)) лишь в незначительной степени подвергается влиянию вирусной инфекции» (Архипов, 2019).

«По-видимому, в процессе персистентной вирусной инфекции характер экспрессии UPF-1-РНК-хеликазного комплекса (UPF-1 интерактома) каким бы то ни было кординальным образом не изменяется, за исключением универсальных декэпирующих факторов DCP1 и DCP2, участвующих во всех процессах RQC» (Архипов, 2019).

«На основании представленных результатов сделан предварительный вывод, согласно которому в исследуемой патосистеме процесс nonsense-mediated decay (NMD) либо не принимает участия в распознавании и деградации вирусных РНК, либо его участие не требует увеличения уровней экспрессии элементов этого комплекса» (Архипов, 2019).

«В процессе данного исследования были обнаружены и идентифицированы транскрипты, кодирующие комплекс факторов аутофагии и RNA-decay в растениях шалота, создана система специфических праймеров, позволяющих определять уровни представленности указанных транскриптов-мишеней методом полимеразной цепной реакции в реальном времени, определены уровни представленности транскриптов, кодирующих базовые факторы аутофагии и RQC на разных этапах персистентной вирусной инфекции шалота» (Архипов, 2019).

«Результаты, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о том, что толерантная реакция растений шалота в условиях персистентной вирусной инфекции специфическим образом сопряжена с изменениями транскрипционных программ экспрессии базовых факторов врожденной иммунной системы. В результате реализации рецепторных и сигнальных функций, присущих факторам фитоиммунитета, в растениях активируются многочисленные и разнообразные иммунные реакции, в то числе РНК-сайленсинг, механизмы аутофагии и RQC. Мы полагаем, что индукция РТІ и обусловленное этим транскрипционное репрограммирование являются механизмами, общими для всех РНК-содержащих вирусов» (Архипов, 2019).

«Дальнейшие исследования молекулярных механизмов, обуславливающих состояние толерантности растений к вирусной инфекции, позволят выяснить, как эти процессы могут быть перепрограммированы с целью конструирования форм с.-х. растений, находящихся во взаимовыгодных симбиотических отношениях с инфицирующими их вирусами» (Архипов, 2019).

5. Репродукция X вируса шалота в чесноке

В России продуктивная репродукция X вируса шалота, наблюдалась только в растениях лука-шалота (Vishnichenko et. al., 1996) и в литературе не встречалось сообщений о репродукции XВШ в иных видах растений.

Однако в последнее время с развитием технологий, сообщается о репродукции XВШ, в частности в луке репчатом, в Судане (K Hamed et.al., 2012). Таким образом представляется интересным возможная детекция X вируса шалота в различных видах рода *Allium*.

В настоящем исследовании представлены данные, подтверждающие наличие вирионов XВШ в чесноке.

Листья тридцати образцов растений чеснока, как бессимптомных (10), так и с явно выраженными симптомами (20) (хлоротические полосы и скручивание листьев), были собраны в июле 2015 года в сельскохозяйственных посадках Алаузи, провинция Чимборасо (Alausí, Chimborazo Province). Семнадцать из тридцати образцов чеснока, протестированных методом Сэндвич-ELISA (double antibody sandwich ELISA) с использованием антител к ShVX (DSMZ AS-1042), показали положительную реакцию, при этом тринадцать объектов из образцов с положительной реакцией ELISA показывали изначально симптомы вирусной инфекции.

Из 100 мг листового материала десяти растений, определенных как зараженные предыдущем методом, выделяли тотальную РНК с использованием модифицированного протокола Trizol (Invitrogen, США) и анализировали методом ОТ-ПЦР на наличие генома ShVX.

При постановке ПЦР использовались вырожденные праймеры (Majumder et. al., 2007):

IAV-F: 5'-CYGCTAAGCTATATGCTGAARGG-3'

IAV-R: 5'-TGTTRCAARGTAAGTTTAGYAATATCAACA-3'.

Был получен ампликон ожидаемого размера около 200 пар оснований.

Дополнительную детектирующую ПЦР проводили с использованием сиквенс-специфических праймеров, разработанных для амплификации фрагмента, размером около 910 пар оснований SHVX, включающего ген белка оболочки (Perez-Egusquiza et al., 2009):

ShVX-CPF: 5'-ATTTAGGGGTGAAGGTCTGT-3';

ShVX-CPR: 5'-GAGTTTTGAGGTCGTTGG-3'.

Ампликоны были непосредственно секвенированы из продуктов ПЦР и депонированы в генбанк (KY012791).

Эквадорский изолят ShVX показал 94% идентичность нуклеотидной последовательности с российским изолятом SHVX (JX310755.1) и от 92 до 94% с новозеландскими изолятами ShVX (EU835197.1, EU835196.1).

Исходя из полученных результатов впервые в мировой литературе подтверждено присутствие ХВШ в Эквадоре и его репродукции в местных сельскохозяйственных культурах чеснока.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основная цель работы состояла в исследовании влияния инфекции X вируса шалота на механизмы иммунной системой растения хозяина, что в свою очередь вызвало необходимость расширить знания о некоторых особенностях молекулярной биологии X вируса шалота: характера эволюционных изменений генома ХВШ в результате длительной репродукции в условиях моноинфекции, природы молекулярных механизмов, позволяющие вирусу репродуцироваться, в растении-хозяине, избегая воздействия антивирусного фитоиммунитета, и возможном видовом разнообразии растений-хозяев для ХВШ в целом.

Наблюдаемое, в ходе настоящего исследования, различие уровней накопления мутаций в разных районах генома ХВШ показывает, что функциональные модули вирусного РНК-генома могут испытывать неодинаковое давление естественного отбора и, как следствие, эволюционировать с разной скоростью. Таким образом различия между родительским выделенным из сорта "Тагар" и исследуемым дочерним изолятами ХВШ, репродуцировавшимся в селекционном образце № 803, являются результатом адаптационных изменений, произошедших в вирусном геноме в результате длительной репродукции в условиях моноинфекции. Причиной наблюдаемых изменений, вероятно, является адаптация к новому растению-хозяину.

Исследование возможной супрессорной активности белков кодируемых 3'-областью ХВШ позволило сделать вывод, что X вирус шалота, по-видимому, репродуцируется в растениях шалота в отсутствии собственного активного белка-супрессора РНК сайленсинга, вероятно подавляя или изменяя экспрессию генов антивирусного фитоиммунитета, с помощью иного механизма, например транскрипционного репрограммирования.

Так, в данном исследовании впервые представлены доказательства экспрессии в растениях шалота нуклеотидных последовательностей, кодирующих три домена различных дайсер-подобных белков и РНК-зависимой РНК-полимеразы, транскрипция которых, как установлено в ходе настоящей работы, полностью подавляется в корнях растений шалота в условиях персистентной инфекции ХВШ.

Представленные данные позволяют сделать вывод и о высокой степени дивергенции дайсер-подобных белков арабидопсиса и ряда других видов относительно *Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don.

Так же полученные в настоящей работе результаты свидетельствовали, что инфекция ХВШ, влияет и на неспецифические факторы антивирусного иммунитета, в частности липид-переносящий белок.

Мы предположили, что механизмом, в результате которого могут избирательно изменяться уровни экспрессии значительного ряда генов, кодирующих факторы антивирусного фитоиммунитета и таким образом, способствующим репродукции ХВШ в отсутствие активного белка-супрессора, может являться специфическое транскрипционное репрограммирование обусловленное РТИ (Pattern-triggered immunity).

Показано, что в условиях персистентной инфекции ХВШ индуцирует в корнях и листьях растений избирательное изменение экспрессии ряда генов-мишеней, включая гены, кодирующие белки-маркеры РТИ, факторы РНК-сайленсинга, NB-LRR рецепторы, липид-трансферные белки, а также белки, принимающие участие в репликации вируса (ТСТР-комплекс) то есть ХВШ инициирует динамический процесс транскрипционного репрограммирования.

Первостепенную роль в развитии антивирусного иммунного ответа в животных системах играют процессы аутофагии, включая прямое связывание вирионов и (или) их компонентов, внутриклеточный транспорт этих комплексов и их деградация в лизосомах. В то же время факторы аутофагии участвующие в антивирусном иммунитете растений изучены совершенно недостаточно.

С другой стороны, в растениях РНК-сайленсинг и RNA-decay являются ключевыми процессами, осуществляющими количественный и качественный контроль пула клеточных информационных РНК. Возникновение структурно или функционально дефектных молекул мРНК индуцирует процесс посттранскрипционного РНК-сайленсинга; в то же время подобные молекулы распознаются и уничтожаются при участии сложного комплекса механизмов контроля качества РНК (RQC, RNA Quality Control).

Поскольку вирусные РНК обладают рядом необычных, с точки зрения клетки, структурных особенностей, эти молекулы также атакуются механизмами RNA-decay, представляющими, таким образом мощный фактор антивирусного иммунитета.

Предположительно, инфекция ХВШ индуцирует процессы аутофагии и изменений транскрипционных программ экспрессии ряда факторов контроля качества РНК (RQC, RNA Quality Control) в шалоте.

В нашем исследовании: (1) были обнаружены и идентифицированы транскрипты, кодирующие комплекс факторов аутофагии и RNA-decay в растениях шалота, (2) создана система специфических праймеров, позволяющих определять уровни представленности указанных транскриптов-мишеней методом полимеразной цепной реакции в реальном времени, (3) определены уровни представленности транскриптов, кодирующих базовые факторы аутофагии и RQC на разных этапах персистентной вирусной инфекции шалота.

Результаты, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о том, что толерантная реакция растений шалота в условиях персистентной вирусной инфекции специфическим образом сопряжена с изменениями транскрипционных программ экспрессии базовых факторов врожденной иммунной системы.

В результате реализации рецепторных и сигнальных функций, присущих факторам фитоиммунитета, в растениях активируются многочисленные и разнообразные иммунные реакции, в то числе РНК-сайленсинг, механизмы аутофагии и RQC.

Мы полагаем, что индукция РТІ и обусловленное этим транскрипционное репрограммирование являются механизмами, общими для всех РНК-содержащих вирусов.

Дальнейшие исследования механизмов молекулярных процессов, обуславливающих состояние толерантности растений к вирусной инфекции, позволят выяснить, как эти процессы могут быть перепрограммированы с целью конструирования форм с.-х. растений, находящихся во взаимовыгодных симбиотических отношениях с инфицирующими их вирусами.

В России продуктивная репродукция X вируса шалота, наблюдалась только в растениях *Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don и в литературе не встречалось сообщений о репродукции ХВІІІ в иных видах растений.

В нашем исследовании представлены данные, подтверждающие наличие вирионов ХВІІІ в местных сельскохозяйственных культурах чеснока в Эквадоре.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что функциональные модули вирусного РНК-генома ХВШ могут испытывать неодинаковое давление естественного отбора и, как следствие, эволюционировать с разной скоростью.

2. Сравнение полученной последовательности генома ХВШ с опубликованной ранее последовательностью родительского изолята, показало, что различия между родительским и дочерним изолятами ХВШ являются результатом адаптационных изменений, произошедших в вирусном геноме.

3. Показано, что ХВШ, по-видимому, репродуцируется в растениях шалота в отсутствие собственного активного белка-супрессора РНК сайленсинга.

4. При исследовании локального сайленсинга установлено что, ни один из протестированных белков ХВШ не обладает супрессорной активностью.

5. В экспериментах по изучению системного сайленсинга показано, что в отличие от своих потекс- и карлавирусного гомологов, TGBp1 белок ХВШ (ORF2) не ингибирует также и системный РНК - сайленсинг.

6. Впервые представлено доказательство экспрессии в растениях шалота нуклеотидных последовательностей, кодирующих три домена различных дайсер-подобных белков, РНК-зависимую РНК-полимеразу и 18s РНК.

7. Представленные данные указывают на высокую степень дивергенции дайсер-подобных белков арабидопсиса и ряда других видов, с одной стороны, и растений рода *Allium*, с другой.

8. Были обнаружены и идентифицированы транскрипты, кодирующие комплекс факторов участвующих в процессах РТІ, аутофагии, и RQC в растениях шалота, создана система специфических праймеров, позволяющих

определять уровни представленности указанных транскриптов-мишеней методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

9. Успешная репродукция и формирование персистентной инфекции ХВШ в *Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don, вероятно, обусловлены способностью вируса полностью или частично изменять экспрессию белков, задействованных в обеспечении антивирусного фитоиммунитета. Подавление экспрессии ключевых факторов РНК-сайленсинга в инфицированных растениях и, контролируемое во времени, избирательное изменение уровней экспрессии ряда генов-мишеней, кодирующих другие факторы антивирусного фитоиммунитета, обусловлено индукцией вирусом процесса РТІ.

10. Показана репродукция ХВШ в чесноке.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аршава Н. В., Конарева Т. Н., Рябов Е. В., Завриев С. К. 42К белок X вируса шалота экспрессируется в инфицированных растениях рода *Allium*. // Молекулярная биология. – 1995. – Т. 29 – С. 192-198.
2. Аршава Н. В., Конарева Т. Н., Черемушкина Н. П., Завриев С. К. Идентификация компонентов вирусного комплекса, персистирующего в культурных растениях рода *Allium*. // Сельскохозяйственная биология. – 1996. – №30. – С. 105-111.
3. Ивановский Д. И. О двух болезнях табака. Табачная пепелица, мозаичная болезнь. // Сельское хозяйство и лесоводство. – 1892. – Т. ССІХХ, вып. 2. – С. 104 – 121.
4. Калошин А. А. Исследование круга хозяев, полиморфизма и клонирование генома X вируса шалота. // Диссертация кандидата биологических наук. – М., 1999 – С.77.
5. Келдыш М. А. Вирусы, вироиды, и микоплазмы растений. // М.: РУДН – 2003. – 153 с.
6. Кленов М. С. Роль РНК-интерференции в подавлении транскрипции ретротранспозонов и tandemных повторов у *D. melanogaster*. // Диссертация кандидата биологических наук. – М., 2005 – С. 136.
7. Логашенко Е. Б. Подавление экспрессии гена MDR1 с помощью малых интерферирующих РНК. // Диссертация кандидата биологических наук. – Новосибирск, 2006 – С. 126.
8. Новикова Н. А. Хранение и реализация генетической информации вирусов. // Н. Новгород – 2007. – С. 84.
9. Омаров Р. Т., Берсимбай Р. И. Биохимические механизмы супрессии РНК интерференции вирусами растений. // Биохимия – 2010. – Т.75 – №8 – С. 1062-1069.
10. Редько В. Г. Модели предбиологической эволюции. // журнал общей биологии. – 2020. – Т81. – №2 – С. 108-122.

11. Рябов Е. Б., Генерозов Э. В., Феттен Г. Д., Завриев С. К. Анализ 3'-концевой области генома переносимого клещем нитевидного вируса свидетельствует о его принадлежности к группе X - вируса шалота. // Молекулярная биология. – 1996. – №30 – С. 104-110.
12. Сизенцов А., Плотников А., Дроздова Е. Общая вирусология с основами таксономии вирусов позвоночных учебное пособие. // Оренбург: Оренбургский государственный университет – 2012. – С. 624.
13. Эйген М. Самоорганизация материи и эволюция биологических макромолекул. // М.: Мир – 1973. – С. 216.
14. Эйген М., Шустер П. Гиперцикл. Принципы самоорганизации макромолекул. // М.: Мир. – 1982. – С. 270.
15. Adams M. J., Candresse T., Hammond J., Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. // Elsevier. – 2011. – P. 902-919.
16. Adams M. J., Antoniw J. F., Bar-Joseph M., et. al. The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. // Arch. Virol. – 2004. – V.149 – P. 1045–1060.
17. Abdelkhalek A., Yassin Y., Abdel-Megeed A., Abd-Elsalam K., Moawad H., Behiry S. Rhizobium leguminosarum bv. viciae-Mediated Silver Nanoparticles for Controlling Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV) Infection in Faba Bean Plants. // Plants (Basel) – 2022. – V. 12 (1) – P. 45.
18. Amarzguioui M., Prydz H. An algorithm for selection of functional siRNA sequences. // Biochem Biophys Res Commun – 2004. – V.316. – P. 1050-1058.
19. Ambros V., Bartel B., Bartel D., Burge C., Carrington J., Chen X., Dreyfuss G., Eddy S., Griffiths-Jones S., Marshall M., Matzke M., Ruvkun G., Tuschl T. A. Uniform system for microRNA annotation. // RNA. – 2003. – V. 9. – P. 277-279.

20. Anantharaman V., Koonin E., Aravind L. Comparative genomics and evolution of proteins involved in RNA metabolism. // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – V. 30 (7) – P. 1427-64.
21. Anjos J.R., Jarlfors U., and Ghabrial S.A. Soybean mosaic potyvirus enhances the titer of two comoviruses in dually infected soybean plants. // *Phytopathology.* – 1992. – V. 82 – P. 17-23.
22. Aravin A. A., Lagos-Quintana M., et. al. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. // *Dev Cell.* – 2003. – V. 5(2) – P. 337-50.
23. Aufsatz W., Mette M. F., Matzke A. J., and Matzke M. The role of MET1 in RNA-directed de novo and maintenance methylation of CG dinucleotides. // *Plant Mol Biol* 2004. – V. 54 – P. 793-804.
24. Axtell M. J., Snyder J. A., et. al. Common functions for diverse small RNAs of land plants. // *Plant Cell.* – 2007. – V. 19(6) – P. 1750-69.
25. Bagasra O., Prilliman K. RNA interference: the molecular immune system. // *Mol. Histol.* – 2004. – V. 35 (6) – P. 545–53
26. Bai M., Yang G. S., Chen W. T., Mao Z. C., Kang H. X., et. al. Genome-wide identification of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families and their expression analyses in response to viral infection and abiotic stresses in *Solanum lycopersicum*. // *Gene* – 2012. – V. 501 – P. 52–62.
27. Baier T., Wichmann J., Kruse O., Lauersen K. Intron-containing algal transgenes mediate efficient recombinant gene expression in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. // *Nucleic Acids Research* – 2018. – V. 46 (13) – P. 6909-6919.
28. Bao N., Lye K. W., and Barton M. K. MicroRNA binding sites in *Arabidopsis* class III HD-ZIP mRNAs are required for methylation of the template chromosome. // *Dev Cell* – 2004. – V. 7 – P. 653-662.
29. Barg E., Lesemann D. E., Vetten H. J., and Green S. K. Identification, partial characterization and distribution of viruses infecting *Allium* crops in South and Southeast Asia. // *Acta Hortic.* – 1994. – V.358 – P.251-258.

30. Barg E., Lesemann D. E., Vetten H. J., and Green S. K. Viruses of alliums and their distribution in different Allium crops and geographical regions. // *Acta Hortic.* – 1997. – V. 433 – P.607-616.
31. Bartel D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. // *Cell.* – 2004. – V. 116(2) – P.281-97.
32. Baulcombe D. RNA silencing in plants. // *Nature.* – 2004. – V.431(7006) – P.356-63.
33. Baumberger N., Tsai C. H., Lie M., Havecker E., and Baulcombe D. C. The Polerovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation // *Curr. Biol.* – 2007. – V. 17 – P. 1609–1614.
34. Beck D. L., Guilford P. J., Voot D. M., Anderson M. T. & Forster R. S. L. Triple gene block proteins of white clover mosaic potexvirus are required for transport. // *Virology.* – 1991. – V. 183 – P. 695-702.
35. Beerenwinkel N., and Zagordi O. Ultra-deep sequencing for the analysis of viral populations. // *Curr.Opin. Virol.* –2011. – V. 1 – P.413–418.
36. Bernstein E., Caudy A. A., Hammond S. M., Hannon G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. // *Nature.* – 2001. – V. 409(6818) – P. 363-366.
37. Beuve M., Stevens M., Liu H.-Y., Hauser S. & Lemaire O. Biological and molecular characterization of an American sugar beet-infecting Beet western yellows virus isolate. // *Plant Dis.* – 2008. – V. 92 – P.51–60.
38. Bohmert K., Camus I., Bellini C., Bouchez D., Caboche M., and Benning C. AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. // *EMBO J.* – 1998. – V. 17 – P. 170-80.
39. Borsani O., Zhu J., et. al. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. // *Cell.* – 2005. – V. 123(7) – P.1279-91.

40. Bortolamiol D., Pazhouhandeh M., Marrocco K., Genschik P., and Ziegler-Graff V. The polerovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. // *Curr. Biol.* – 2007 – V. 17 – P.1615-1621.
41. Bousalem M., Douzery E.J. and Fargette D. Highgenetic diversity, distant phylogenetic relationships and intraspecies recombination events among natural populations of Yam mosaic virus: a contribution to understanding potyvirus evolution. // *J. Gen. Virol.* – 2000. – V. 81 – P. 243-255.
42. Bragg J.N., and Jackson A. O. The C-terminal region of the Barley stripe mosaic virus γ b protein participates in homologous interactions and is required for suppression of RNA silencing. // *Mol. Plant Pathol.* – 2004 – V. 5 – P. 465-481.
43. Bratlie M. S. & Drablos F. Bioinformatic mapping of AlkB homology domains in viruses. // *BMC Genomics* –2005– V.6 – P.1.
44. Brault V., van den Heuvel J. F. J. M., Verbeek M., Ziegler-Graff V., Reutenauer A., Herrbach E., Garaud J. C., Guilley H., Richards K. & Jonard G. Aphid transmission of beet western yellows luteovirus requires the minor capsid read-through protein P74. // *EMBO J.* –1995. – V. 14 – P.650-659.
45. Brigneti G., Voinnet O., Wan-Xiang L., Ding S. W., Baulcombe D. C. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing. // *EMBO J.* – 1998. – V. 17 – P. 6739-6746
46. Bruyere A., Wantroba M., Flasiński S., Dzianott A., Bujarski J.J. Frequent homologous recombination events between molecules of one RNA component in a multipartite RNA virus. // *J. Virol.* – 2000. – V. 74(9) – P. 4214-9.
47. Bujarski J.J., Kaesberg P. Genetic recombination between RNA components of a multipartite plant virus. // *Nature.* – 1986 – V. 321 – P. 528-531
48. Bujarski J.J. Genetic recombination in plant-infecting messenger-sense RNA viruses: overview and research perspectives. // *Front Plant Sci.* –2013. – V. 26 – P.4-68.

49. Carrington J. C., Freed D. D., and Oh C.-S. Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three pro-teolytic activities required for complete processing. // *EMBO J.* –1990 – V. 9 – P. 1347-1353.
50. Carthew R. W., and Sontheimer E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. // *Cell.* – 2009. – V. 136 – P. 642-655.
51. Cascone P. J., Carpenter, C. D., Li, X. H., and Simon, A. E. Recombination between satellite RNAs of turnip crinkle virus. // *EMBO J.* –1990. – V. 9 – P. 1709-1715.
52. Catalonotto C., Azzalin G., Macino G., and Cogoni C. Gene silencing in worms and fungi. // *Science.* – 2000. – V. 305(5689) – P.1434-7.
53. Caudy A. A., Ketting R. F., Hammond S. M., Denli A. M., Bathoorn A. M., Tops B. B., Silva J. M., Myers M. M., Hannon G. J., Plasterk R. H. A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. // *Nature.* – 2003. – V.425 (6956) – P.411-414.
54. Chalk A. M., Wahlestedt C., Sonnhammer E. L. Improved and automated prediction of effective siRNA. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2004. – V.319 (1) – P. 204-274.
55. Chan S. W., Zilberman D., Xie Z., Johansen L. K., Carrington J. C., and Jacobsen S. E. RNA silencing genes control de novo DNA methylation. // *Science.* – 2004. – V. 303 (5662) – P. 1336.
56. Chapman E. J., and Carrington J. C. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. // *Nat Rev Genet.* – 2007. – V. 8(11) – P. 884-96.
57. Chen J., Chen J., Adams M. J. Molecular characterisation of a complex mixture of viruses in garlic with mosaic symptoms in China. // *Arch Virol.* – 2001. – V. 146 – P.1841-1853.
58. Clark R. L., Hill J. H., and Ellis M. D. Tomato scorch, a new virus disease of tomatoes. // *Phytopathology.* –1980. – V. 70 – P.131-134.

59. Cogoni C., Macino G. Homology-dependent gene silencing in plants and fungi: a number of variations on the same theme. // *Curr Opin Microbiol.* – 1999. – V. 2 – P.657-662.
60. Cooper P. D. On the nature of poliovirus genetic recombination. // *J. Gen. Virol.* – 1974. – V. 23 – P. 41-49.
61. Csorba T., Bovi A., Dalmay T. and Burgyan J. The p122 subunit of Tobacco mosaic virus replicase is a potent silencing suppressor and compromises both siRNA and miRNA mediated pathways. // *Journal of Virology.* – 2007. – V. 81 (21) – P.11768-11780.
62. 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. – V. 313 – P.68–71.
63. Diaz-Pendon J. A., Li F., Li W.X., and Ding S.W. Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in Arabidopsis is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. // *Plant Cell.* – 2007. – V. 19 – P. 2053–2063.
64. Ding S. W., and Voinnet O. Antiviral immunity directed by small RNAs. // *Cell.* – 2007. – V. 130 – P. 413-426.
65. Djupedal I., Ekwall K. Epigenetics: heterochromatin meets RNAi. // *Cell Res.* – 2009. – V. 19 – P. 282–295.
66. Dlakic M. DUF283 domain of Dicer proteins has a double-stranded RNA-binding fold. // *Bioinformatics.* – 2006. – V. 22 – P. 2711–2714.
67. Dolja V. V., Kreuze J. F., Valkonen J. P. Comparative and functional genomics of closteroviruses. // *Virus. Res.* – 2006. – V. 117 – P. 38–51.
68. Domingo E., and Holland J. J. RNA virus mutations and fitness for survival. // *Annu.Rev. Microbiol.* – 1997. – V. 51 – P. 151–178.
69. Domingo E. Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. // *Cell.* – 1978. – V. 13(4) – P. 735-744.

70. Drake J.W. and Holland J.J. Mutation rates among RNA viruses. // *Procl. Natl. Acad. Sci.* – 1999. – V. 96(24) – P. 13910.
71. Duffy S., Shackelton L.A., Holmes E.C. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. // *Nat Rev Genet.* – 2008. – V. 9(4) – P. 267-76.
72. 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 (12). – P. 1356-1360.
73. Dunoyer P., Gregory Schott G., Christophe Himber C., Meyer D., Takeda A., Carrington J. C., Voinnet O. Small RNA Duplexes Function as Mobile Silencing Signals Between. // *Science.* – 2010. – V. 328 – P. 912-916.
74. Dutta M., Sokhandan Bashir N. and Melcher U. Genomic characterization of AAV1 and evidence of other flexiviruses in Oklahoma Tallgrass Prairie Preserve revealed by sequence analysis and genomic organization. // Не опубликовано – 2013. – Анноттировано в NCBI от Biochemistry and Molecular Biology Oklahoma State University
75. Ebhardt H. A., Thi E. P., Wang M.-B., Unrau P. J. Extensive modification of plant small RNAs is modulated by helper component-protease expression. // *Proc. Natl Acad. Sci.* – 2005. – V. 102 (38) – P.13398-13403.
76. Eigen M., McCaskill J., and Schuster P. Molecular quasispecies. // *J. Phys.Chem.* – 1988. – V. 92 – P. 6881-6891.
77. Eigen M., McCaskill J., and Schuster P. The molecular quasispecies. // *Adv.Chem.Phys.* – 1989. – V. 75 – P. 149-263.
78. Elbashir S. M., Lendeckel W., Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22- nucleotide RNAs. // *Genes Dev.* – 2001. – V. 15(2) – P. 188-200.
79. Escribe F., Fraile A., García-Arenal F. The evolution of virulence in a plant virus. // *Evolution.* – 2003. – V. 57 – P.755-765

80. Fagard M., Boutet S., Morel J. B., Bellini C., and Vaucheret H. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. // *Proc Natl Acad Sci.* – 2000. – V. 97 – P. 11650-4.

81. Fire A., Xu S., Montgomery M. et. al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. // *Nature.* – 1998. – V. 391 – P. 806-811.

82. Forstemann K., Horwich M. D., Wee L., Tomari Y., and Zamore P. D. *Drosophila* microRNAs are sorted into functionally distinct argonaute complexes after production by *dicer-1*. // *Cell.* – 2007. – V. 30 – P. 287-297.

83. Frank F., Hauver J., Sonenberg N., Nagar B. Arabidopsis Argonaute MID domains use their nucleotide specificity loop to sort small RNAs. // *EMBO J.* – 2012. – V.31(17) – P. 3588-95.

84. Gaill Pruss, Xin Ge, Xing Ming Shi, James C. Carrington, and Vicki Bowman Vance. Plant Viral Synergism: The Potyviral Genome Encodes a Broad-Range Pathogenicity Enhancer That Transactivates Replication of Heterologous Viruses». // *The plant Cell.* – 1997. – V. 9 – P. 859-868.

85. Gaspar Y. M., NamJ., Schultz C. J., Lee L., Gilson P., Gelvin S., Bacic A. Characterization of the Arabidopsis lysine-rich arabinogalactan-protein AtAGP17 mutant (*rat1*) that results in a decreased efficiency of agrobacterium transformation. // *Plant Physiology* – 2004. – V. 135 (4) – P. 2162-71.

86. Ghazala W., Waltermann A., Pilot R., Winter S., Varrelmann M. Functional characterization and subcellular localization of the 16K cysteine-rich suppressor of gene silencing protein of tobacco rattle virus. // *J. Gen Virol.* – 2008. – V. 89 (Pt 7) – P. 1748-1758.

87. Golden D. E., Gerbasi V. R., and Sontheimer E. J. An inside job for siRNAs. // *Mol Cell.* – 2008. – V. 31 – P. 309-312.

88. Goto K., Kobori T., Kosaka Y., Natsuaki T., and Masuta C. Characterization of silencing suppressor 2b of cucumber mosaic virus based on

examination of its small RNA-binding abilities. *Plant Cell. // Physiol.* – 2007. – V. 48 – P. 1050–1060.

89. Hamed K., Menzel W., Mohamed M. E., Dafallah G., Gadelseed A. M., Winter S. First Report of Shallot virus X in Onion in Sudan. // *Plant Disease.* – 2012. – V. 96 (7) – P. 1075-1075.

90. Hammond S. M., Boettcher S., Caudy A. A., Kobayashi R., Hannon G. J. Argonaute 2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. // *Science.* – 2001. – V.293 (5532) – P. 1146-1150.

91. Hammond S. M., Bernstein E., Beach D., and Hannon G. J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. // *Nature.* – 2000. – V. 404 – P. 293-296.

92. Hannon G. J. RNA interference. // *Nature.* – 2002. – V. 418 – P. 244-251.

93. Hasiow-Jaroszewska B., Kuzniar A., Peters S.A., Leunissen J.A., Pospieszny H. Evidence for RNA recombination between distinct isolates of Pepino mosaic virus. // *Acta Biochim Pol.* – 2010. – V.57(3) – P.385-8.

94. Helguera M., Rabinowicz P.D., Kobayashi K., et. al. Identification and characterization of a coat protein gene from a garlic mite-borne filamentous virus present in Argentina. // *Plant Dis.* – 1996. – V. 76 – P.594-596.

95. Huesken D., Lange J., Mickanin C., Weiler J., Asselbergs F., Warner J., Meloon B., Engel S., Rosenberg A., Cohen D., Labow M., Reinhardt M., Natt F., Hall J. Design of a genome-wide siRNA library using an artificial neural network. // *Nat Biotechnol.* – 2005. – V.23 (8) – P. 995-1001.

96. Huisman M. J., Linthorst H. J. M., Bol J. F. & Cornelissen B. The complete nucleotide sequence of potato virus X and its homologues at the amino acid level with various plus-stranded RNA viruses. // *Journal of General Virology.* – 1988. – V. 69 – P. 1789-1798.

97. Hunter W. B., Lapointe S. L., Sinisterra X. H., Achor D. S., Funk C. J. Iridovirus in the root weevil *Diaprepes abbreviatus*. // Journal of Insect Science. – 2003. – V. 3 – P. 9.
98. ICTV, Virus Taxonomy. 2022 Release.
99. Iwasa Y., Michor F., and Nowak M. A. Evolutionary dynamics of invasion and escape. // J. Theor. Biol. – 2004. – V. 226 – P. 205-214.
100. Jeffery L. and Nakielny S. Components of the DNA methylation system of chromatin control are RNA-binding proteins. // J. Biol. Chem. – 2004. – V. 279 – P. 49479-49487.
101. Jelkmann W., Martin R. R., Lesemann D. E., Vetten H. J. & Skelton F. A new potexvirus associated with strawberry mild yellow edge disease. // Journal of General Virology. – 1990. – V. 71 – P. 1251-1258
102. Jelkmann W., Kunze L., Vetten H. J., Lesemann D.E. cDNA cloning of dsRNA associated with apple stem pitting disease and evidence for the relationship of the virus-like agents associated with apple stem pitting and pear vein yellows. // ACTA HORT. – 1992. – V. 309 – P. 55-62.
103. Joseph C., Kuhl J. C., Cheung F. et. al. A unique set of 11,008 onion expressed sequence tags reveals expressed sequence and genomic differences between the monocot orders asparagales and poales. // The Plant Cell. – P. 2004 – V. 16 – P. 114-125
104. Kanyuka K. V., Vishnichenko V. K., Levay K. E., Kondrikov D. Yu., Ryabov E. V. and Zavriev S. K. Nucleotide sequence of shallot virus X RNA reveals a 5'-proximal cistron closely related to those of potexviruses and a unique arrangement of the 3'-proximal cistrons. // Journal of General Virology. – 1992. – V. 73 – P. 2553-2560.
105. Kapoor M., Arora R., Lama T., Nijhawan A., Khurana J. P., et. al. Genomewide identification, organization and phylogenetic analysis of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families and their

expression analysis during reproductive development and stress in rice. // BMC Genomics. – 2008 – V. 9 – P. 451.

106. Kasschau K. D., Carrington J. C. A counter-defensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. // Cell. – 1998. – V. 95 – P. 461-470.

107. Katis NI, Maliogka VI, Dovas CI. Viruses of the genus Allium in the Mediterranean region. // Adv Virus Res. – 2012 – V. 84 – P.163-208.

108. Khvorova A., Reynolds A., and Jayasena S. D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. // Cell. – 2003. – V. 115 – P. 209-216.

109. Kidner C.A., Martienssen R. A. Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. // Nature. – 2004. – V. 428 – P. 81-84

110. Kim D.W., Jung T.-S., Nam S. H. et.al. GarlicESTdb: an online database and mining tool for garlic EST sequences. // BMC Plant Biol. – 2009. – V. 9 – P. 61.

111. Kim D. H., Villeneuve L. M., Morris K. V., Rossi J. J. Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. // Nat Struct Mol Biol. – 2006. – V. 13(9) – P. 793-797.

112. King A. M. Recombination in positive strand RNA virus // In RNA genetics, CRC Press. – 1988. – P. 149-165.

113. Kini H. K., Walton S. P. In vitro binding of single-stranded RNA by human Dicer. // FEBS Lett. – 2007. – V. 581 – P. 5611-5616.

114. Koonin E.V. and Dolja. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of coomparative analysis of amino acid sequences. // CRC Crit. Rev. Biochem Molec. Biol. – 1993. – V. 28(5) – P. 375-430

115. Korner C.J., Klauser D., Niehl A., Dominguez-Ferreras A., Chinchilla D., Boller T., Heinlein M., Hann1 D.R. The immunity regulator BAK1 contributes to resistance against diverse RNA viruses. // Mol. Plant Microbe Interact. – 2013 – V. 26 – P. 1271-1280.

116. Kozak M. Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. // *Microbiol.* – 1983. – V. 47 – P. 1–45.
117. Kozłowska-Makulska A., et. al. P0 proteins of European beet-infecting poleroviruses display variable RNA silencing suppression activity. // *Journal of General Virology.* – 2009. – V. 91 (4) – P. 1082-91
118. Kurihara Y., Watanabe Y., Takashi Y. The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. // *RNA.* – 2006. – V. 12 (2) – P. 206-212.
119. Lai M. C. RNA recombination in animal and plant viruses. // *Microbiol.* – 1992 – V.56 – P. 61-79.
120. Lakatos L., Csorba T., Pantaleo V., Chapman E. J., Carrington J. C., Liu Y.-P., Dolja V., Calvino L. F., Lopez-Moya J. J. & Burgyan J. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. // *EMBO J.* – 2006. – V. 25 – P. 2768-2780.
121. Lee Y. S., Nakahara K., Pham J. W., Kim K., He Z., Sontheimer E. J., Carthew R. W. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. // *Cell.* – 2004. – V. 117 (1) – P. 69-81.
122. Lingel A., Simon B., Izaurralde E., Sattler M. Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. // *Nature.* – 2003. – V.426 (6965) – P. 465-469.
123. Liu S., Yang B., Gu J., Yao X., Zhang Y., Song F., Liu Z. Molecular cloning and characterization of a juvenile hormone esterase gene from brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. // *Journal of Insect Physiology.* – 2008. – V. 54 – P. 1495-1502.
124. Lohmann J. U., Endl I., and Bosch T. C. Silencing of Developmental Genes in *Hydra*. // *Dev Biol.* – 1999. – V. 214 – P. 211-214.
125. Lu Y., Yan F., Guo W., et. al. Garlic virus X 11-kDa protein granules move within the cytoplasm and traffic a host protein normally found in the nucleolus. // *Mol. Plant Pathol.* – 2011. – V. 12. – P. 666-676.

126. Luo Z., Chen Z. Improperly terminated, unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in Arabidopsis. // *Plant Cell*. – 2007. – V. 19 – P. 943–958.
127. Ma J. B., Ye K., Patel D. J. Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. // *Nature*. – 2004. – V.429 (6989) – P. 318-322.
128. Machado J. // 2006. – аннотация в NCBI.
129. Macrae I. J., Zhou K., Li F., Repic A., Brooks A. N., Cande W. Z., Adams P. D., Doudna J. A. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. // *Science*. – 2006. – V. 311 – P. 195-198.
130. Majumder S., Arya M., Pant R. P., Baranwal V. K. Shallot virus X in Indian shallot, a new virus report for India. // *New Disease Reports*. – 2007. – V. 15 – P. 52.
131. Majumder S., Baranwal V. K. Sequence Comparison and Phylogeny of Nucleotide Sequence of Coat Protein and Nucleic Acid Binding Protein of a Distinct Isolate of Shallot virus X from India. // *Indian J. Virol*. – 2011. – V. 22 (1) – P. 63-65
132. Mansouri F., Rysanek P. Allexivirus: review and perspectives. // *Phytopathologia Mediterranea*. – 2021. – V. 60 (3) – P. 389-402.
133. Margis R., Fusaro A. F., Smith N. A., Curtin S. J., Watson J. M., Finnegan E. J., Waterhouse P. M. The evolution and diversification of Dicers in plants. // *FEBS Letters*. – 2006. – V. 580– P. 2442-2450.
134. Martelli G. P., Adams M. J., Kreuze J. F., et. al. Family Flexiviridae: a case study in virion and genome plasticity. // *Annu. Rev. Phytopathol*. – 2007. – V. 45 – P. 73-100.
135. Martinez J., Tuschl T. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. // *Genes Dev*. – 2004. – V.18 (9) – P. 975-980.
136. Martinez-Priego L., Donaire L., Barajas D., and Llave C. Silencing suppressor activity of the Tobacco rattle virus-encoded 16-kDa protein and

interference with endogenous small RNA-guided regulatory pathways. // *Virology*. – 2008. – V. 376 – P. 346–356.

137. Matzke M.A., Matzke A.J., Pruss G.J., Vance V.B. RNA-based silencing strategies in plants. // *Curr Opin Genet Dev*. – 2001 – V. 11(2) – P. 221-7.

138. Mavric I., and Ravnikar M. A carlavirus serologically closely related to Carnation latent virus in Slovenian garlic. // *Acta Agric*. – 2005 – V. 85(2) – P. 343-349.

139. Mello C. C., Conte D. Revealing the world of RNA interference. // *Nature*. – 2004. – V. 431 – P. 338–342.

140. Memelink J., Van Der Vlugt C. I. M., Linthorst H. J. M., Asjes C. J. & Bol J. F. Homologies between the genomes of a carlavirus (lily symptomless virus) and a potexvirus (lily virus X) from lily plants. // *Journal of General Virology*. – 1990. – V. 71 – P. 917-924.

141. Merai Z., Kerenyi Z., Kertesz S., Magna M., Lakatos L., and Silhavy D. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. // *J. Virol*. – 2006. – V. 80 – P. 5747-5756.

142. Mitter N., Worrall E.A., Robinson K.E., Ping X.Z., Carroll B.J. Induction of virus resistance by exogenous application of double-stranded RNA. // *Curr. Opin. Virol*. – 2017 – V. 26 – P. 49-55

143. Mlotshwa S., Pruss G. J., et. al. DICER-LIKE2 plays a primary role in transitive silencing of transgenes in Arabidopsis. // *PLoS ONE*. – 2008. – V. 3 (3) – P. e1755.

144. Moonan F., Molina J., and Mirkov T.E. Sugarcane yellow leaf virus: an emerging virus that has evolved by recombination between luteoviral and poleroviral ancestors. // *Virology*. – 2000. – V. 269 – P. 156-171.

145. Morozov S. Y., Solovyev A. G. Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. // *J. Gen. Virol*. – 2003. – V. 84 – P. 1351-1366.

146. Morse D. P., Aruscavage P. J., Bass B. L. RNA hairpins in noncoding regions of human brain and *Caenorhabditis elegans* mRNA are edited by adenosine deaminases that act on RNA // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2002. – V. 99 (12) – P. 7906-7911.
147. Nagy P.D., and Pogany J. The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. // *Nat Rev Microbiol*. – 2011. – V. 10 – P. 137-149.
148. Nagy P.D., Simon A.E. New insights into the mechanisms of RNA recombination // *Virology*. – 1997. – V. 235 – P. 1-9.
149. Nagy P. D., and Bujarski J. J. Efficient system of homologous RNA recombination in bromo mosaic virus: sequence and structure requirements and accuracy of crossovers. // *J. Virol*. – 1995 – V. 69 – P. 131-140.
150. Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. Introduction of chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible cosuppression of homologous genes in trans. // *Plant Cell*. – 1990. – V. 2 – P. 279-289.
151. Needleman S. B., Wunsch C. D. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. // *J. Mol Biol*. – 1970. – V. 48 – P. 443-453.
152. Niehl A., Wyrsh I., Boller T., Heinlein M. Double-stranded RNAs induce a pattern-triggered immune signaling pathway in plants. // *New Phytol*. – 2016 – V. 211(3) – P. 1008-1019.
153. Nowak M. A. What is a quasispecies? // *Trends Ecol. Evol*. – 1992. – V. 7 – P. 118-121.
154. Nykanen A., Haley B., Zamoroc P. D. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. // *Cell*. – 2001. – V. 107 (3) – P. 309-321.
155. Ojosnegros S., Beerenwinkel N., Antal T., Nowak M. A., Escarmis C., and Domingo E. Competition-colonization dynamics in an RNA virus. // *Proc. Natl. Acad. Sci*. – 2010. – V. 107 – P. 2108-2112.

156. Pagan I. and Holmes E. Long-Term Evolution of the Luteoviridae: Time Scale and Mode of Virus Speciation. // J Virol. – 2010 – V. 84(12) – P. 6177–6187.
157. Pandey S. P., Baldwin I. T. RNA-directed RNA polymerase1 (RdR1) mediates the resistance of *Nicotiana attenuata* to herbivore attack in nature. // Plant J. – 2007. – V. 50 – P. 40-53.
158. Pantaleo V., Szittyá G., and Burgyan J. Molecular bases of viral RNA targeting by viral small interfering RNA-programmed RISC. // J. Virol. – 2007. – V. 81 – P. 3797-3806.
159. Perez-Egusquiza Z., Ward L. I., Clover G. R. G., Fletcher J. D., Van Der Vlugt R. A. A. First report of Shallot virus X in shallot in New Zealand. // Plant Pathology – 2009 – V. 58(2) – P. 407-407.
160. Perotto M. C., Conci V. C., Cafrune E. E., Alochis P., and Bracamonte R. Differences in the response of garlic cultivars to the eradication of five viruses. // Phyton. – 2003. – V. 126 – P. 489-495.
161. Pfeffer S., Dunoyer P., Heim F., Richards K. E., Jonard G., and Ziegler-Graff V. P0 of beet Western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. // J. Virol. – 2002. – V. 76 – P. 6815-6824.
162. Plisson C., Drucker M., Blanc S., German-Retana S., Le Gall O., Thomas D. et. al. Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278 – P. 23753-23761.
163. Postnikova O. A., Nemchinov L. G. Comparative analysis of microarray data in *Arabidopsis* transcriptome during compatible interactions with plant viruses. // Virology Journal. – 2012. – V. 9 – P. 101.
164. Pramesh D., Baranwal V.K. Molecular characterization of coat protein gene of Garlic common latent virus isolates from India: an evidence for distinct phylogeny and recombination. // Virus Genes. – 2013. – V. 47(1) – P.189-93.
165. Pybus O.G., and Rambaut A. Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease. // Nat. Rev. Genet. – 2009. – V. 10 – P. 540-550.

166. Qian Y., Cheng Y., Cheng X., Jiang H., Zhu S., et. al. Identification and characterization of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families in maize. // *Plant Cell*. – 2011. – V. 30 – P. 1347-1363.
167. Qu F., Ye X., Morris T. J. Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. // *Proc Natl Acad Sci* – 2008. – V. 105 – P. 14732-14737.
168. Qu F., and Morris T.J. Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by Tomato bushy stunt virus is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 2002. – V. 15 – P. 193–202.
169. Rakitina D. V., Yelina N. E., and Kalinina N. O. Zinc ions stimulate the cooperative RNA binding of hordeiviral gammab protein. // *FEBS Lett.* – 2006. – V. 580 – P. 5077-5083.
170. Rana T. M. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2007. – V. 8 – P. 23-36.
171. Razvjazkina G.M. Daz Zwiebelmosaikvirus und seine Verbreitung im freiland. // *Tagungsbericht, Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der Deutschen Demokratischen Republik.* – 1971. – V. 115 – P. 69-76.
172. Reynolds A., Leake D., Boese Q., Scaringe S., Marshall W. S., Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. // *Nat Biotechnol.* – 2004. – V. 22 (3) – P. 326-330.
173. RNAi. gene-quantification.info
174. Rochow W.F., and Ross A.F. Virus multiplication in plants doubly infected by potato viruses X and Y. // *Virology.* – 1955. – V. 1 – P. 10-27.
175. Romanova L.I., Tol'skaia E.A., Agol V.I. Intertypic antigenic determinants of intracellular proteins of different poliovirus serotypes. // *Vopr Virusol.* – 1980. – V. 5 – P.570-3.
176. Sabanadzovic S. Blackberry virus E: an unusual flexivirus. // *Arch Virol.* – 2011. – V. 156(9) – P.1665-9.

177. Schiebel W., Pelissier T., Riedel L., Thalmeir S., Schiebel R., et. al. Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. // *Plant Cell*. – 1998. – V. 10 – P. 2087-2101.
178. Scholthof H. B. Plant virus transport: motions of functional equivalence. // *Trends Plant Sci*. – 2005. – V. 10 – P. 376-382.
179. Schwach F., Vaistij F. E., Jones L., Baulcombe D. C. An RNA-Dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. // *Plant Physiol*. – 2005. – V. 138 (4) – P. 1842-1852.
180. Schwarz D. S., Hutvagner G., Haley B., Zamore P. D. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the Drosophila and human RNAi pathways. // *Mol Cell*. – 2002. – V.10 (3) – P. 537-548.
181. Senshu H., Yamaji Y., Minato N., Shiraishi T., Maejima K., Hashimoto M., Miura C., Neriya Y., Namba S. A dual strategy for the suppression of host antiviral silencing: two distinct suppressors for viral replication and viral movement encoded by potato virus M. // *J. Virol*. – 2011. – V.85 – P.10269-78.
182. Serviène E., Shapka N., Cheng C.P., Panavas T., Phuangrat B., Baker J. Genome wide screen identifies host genes affecting viral RNA recombination. // *Proc. Natl. Acad. Sci*. – 2005. – V. 102 – P. 10545-10550.
183. Shallot virus X NCBI GenBank: NC_003795.1
184. shRNA library - Rigel Pharmaceuticals, Inc. United States. Patent 7863222.
185. Shibolet Y. M., Haronsky E., Leibman D., Arazi T., Wassenegger M., Whitham S.A. et. al. 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. 13135-13148.
186. Sijen T., Fleenor J., Simmer F., Thijssen K. L., Parrish S., Timmons L., Plasterk R. H., Fire A. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. // *Cell*. – 2001. – V. 107 (4) – P. 465-476.

187. Singh L., Hallan V., Martin D.P., Ram R., Zaidi A.A. Genomic sequence analysis of four new chrysanthemum virus B isolates: evidence of RNA recombination. // Arch Virol. – 2012. – V. 157(3) – P. 531-7.
188. Singh L., Hallan V., Jabeen N., Singh A.K., Ram R., Martin D.P., Zaidi A.A. Coat protein gene diversity among Chrysanthemum virus B isolates from India. // Arch Virol. – 2007 – V. 152(2) – P. 405-13.
189. Song J. J., Smith S. K., Hannon G. J., Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. // Science. – 2004. – V. 305 (5689) – P. 1434-1437.
190. Song S. I., Song J. T., Kim C. H., Lee J. S. and Choi Y. D. Molecular characterization of the garlic virus X genome. // Journal of General Virology. – 1998. – V. 79 – P. 155-159.
191. Steinhauer D.A., Domingo E., Holland J.J. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. // Gene. – 1992. – V. 122 – P. 281–288.
192. Stevens M., Freeman B., Liu H.-Y., Herrbach E. & Lemaire O. Beet poleroviruses: close friends or distant relatives? // Mol Plant Pathol. – 2005. – V. 6 – P. 1-9.
193. Sumi S., Matsumi T., Tsuneyoshi T. Complete nucleotide sequences of garlic viruses A and C, members of the newly ratified genus Allexivirus. // Arch Virol. – 1999. – V. 144 – P. 1819-1826.
194. Sumi S., Tsuneyoshi T., Furutani H. Novel rod-shaped viruses isolated from garlic, *Allium sativum*, possessing a unique genome organization. // J. Gen Virol. – 1993. – V. 74 – P. 1879-1885.
195. Sumi S., Matsumi T. and Tsuneyoshi T. Complete nucleotide sequence of garlic viruses A and C, members of newly ratified genus Allexivirus. // Arch Virol. – 1999. – V. 144 – P. 1819-1827.

196. Tabara H., Sarkissian M., Kelly W. G., Fleenor J., Grishok A., Timmons L., Fire A., and Mello C. C. The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon si-lencing in *C. elegans*. // *Cell*. – 1999. – V. 99 (2) – P. 123-32.
197. Tahbaz N., Kolb F. A., Zhang H., Jaronczyk K., Filipowicz W., Hobman T. C. Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. // *EMBO*. – 2004. – V. 5 – P. 189-194.
198. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. // *Molecular Biology and Evolution*. – 2011. – V. 28 – P. 2731-2739.
199. Toman Y., Du T., Haley B., Schwarz S., Bennett R., Cook H. A., Koppetsch B. S., Theurkauf W. E., Zamore P. D. RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant *armitage*. // *Cell*. – 2004. – V.116 (6) – P. 831-841.
200. Tomari Y., Du T., and Zamore P. D. Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. // *Cell*. – 2007. – V. 130 – P. 299-308.
201. Tournier B., Tabler M., Kalantidis K. Phloem flow strongly influences the systemic spread of silencing in GFP *Nicotiana benthamiana* plants. // *Plant J*. – 2006. – V. 47 (3) – P. 383-394.
202. Vaistij F.E., Jones L. and Baulcombe D.C. Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. // *Plant Cell*. – 2002. – V. 14 – P. 857-867.
203. Van der Krol A. R., Mur L. A., Beld M., Mol J. N., and Stuitje A. R. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. // *Plant Cell*. – 1990. – V. 2 – P. 291-9.
204. Van Dijk P., Verbeek M. and Bos L. Mite-borne virus isolates from cultivated *Allium* species, and their classification into two new rhymoviruses in the family Potiviridae. // *Nederlands Journal of Plant Pathology*. – 1991. – V. 97 – P. 381-399.

205. Van Dijk P. Carlavirus isolates from cultivated *Allium* species represent three viruses. // *Neth. J. Plant Pathol.* – 1993. – V. 99 – P. 233-257.
206. Vance V. B., Berger P. H., Carrington J. C., Hunt A. G., and Shi X. M. 5' proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. // *Virology.* – 1995. – V. 206 – P. 583-590.
207. Varrelmann M., Palkovics L., Maiss E. Transgenic or plant expression vector-mediated recombination of Plum Pox Virus. // *J. Virol.* – 2000. – V. 74(16) – P. 7462-9.
208. Vaucheret H., Vazquez E., Crete P., and Bartel D.P. The action of ARGONAUTE 1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. // *Genes Dev.* – 2004. – V. 18 – P 1187-1197.
209. Vishnichenko et. al. The 42K Protein of Shallot Virus X Participates in Formation of Virus Particles. // *Molecular Biology.* – 2002. – V. 36 (6) – P. 879-882.
210. Vishnichenko V. K., Konareva T. N. and Zavriev S. K. A new filamentous virus in shallot. // *Plant Pathology.* – 1993. – V. 42 – P. 121-126.
211. Vishnichenko V. K., Kaloshin A. A., Riabov E. V., Zavriev S. K. Cloning of full-length cDNA of the shallot's virus X genome and infectivity of its transcripts in sugar beet protoplasts. // *Mol Biol.* – 2000. – V. 34(1) – P. 167-71.
212. Vishnichenko V. K., Zavriev S. K. Detection of infectious viral particles in plant protoplasts inoculated with transcripts of full-length shallot virus X cDNA. // *Arch Virol.* – 2001 – V. 146(6) – P. 1213-7.
213. Vishnichenko V. K., Stelmashchuk V. Y., and Zavriev S. K. Cloning of full-length cDNA of the Shallot virus X genome and infectivity of its transcripts in sugar beet protoplasts. // *Mol. Biol.* – 1996. – V. 30 – P. 959.
214. Vogler H., Akbergenov R., Shivaprasad P.V., Dang V., Fasler M., Kwon M. O. et. al. Modification of small RNAs associated with suppression of RNA silencing by tobamovirus replicase protein. // *J. Virol.* – 2007. – V. 81 – P. 10379-10388.

215. Voinnet O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. // *Cell*. – 2009. – V. 136 – P. 669-687.
216. Voinnet O. Non-cell autonomous RNA silencing. // *FEBS Lett*. – 2005. – V. 579 (26) – P. 5858-5871.
217. Voinnet O., Lederer C., and Baulcombe D. C. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. // *Cell*. – 2000. – V. 103 – P. 157-67.
218. Voinnet O., Pinto Y. M. & Baulcombe D. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. // *Proc Natl Acad Sci*. – 1999. – V. 96 – P. 14147-14152.
219. Vrbisky J., Akimcheva S., Watson J. M., Turner T. L., Daxinger L., et. al. siRNA-mediated methylation of *Arabidopsis* telomeres. // *PLoS Genet*. – 2010. – V. 6 – P. e1000986.
220. Wassenegger M., Krczal G. Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. // *Trends Plant Sci*. – 2006. – V. 11 – P. 142-151.
221. Watson C. J. & Jackeson J. F. An alternative procedure for the synthesis of double -stranded cDNA for cloning in phage and plasmid vectors. In: *DNA cloning: a practical approach*. // *DNA Cloning: A Practical Approach*. – 1986. – V. 1 – P. 79–88.
222. Weinberg M. S., Villeneuve L. M., Ehsani A., Amarzguioui M., Aagaard L., Chen Z. X., Riggs A. D., Rossi J. J., Morris K. V. The antisense strand of small interfering RNAs directs histone methylation and transcriptional gene silencing in human cells. // *RNA*. – 2006. – V. 12 (2) – P. 256-262.
223. Willmann M. R., Endres M. W., Cook R. T., Gregory B. D. The functions of RNA-dependent RNA polymerases in *Arabidopsis*. // *The Arabidopsis Book*. – 2011. – V. 9 – P. e0146.
224. Winston W. M., Molodowitch C., and Hunter C. P. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. // *Science*. – 2002. – V. 295 – P. 2456-2459.

225. Wylie S. J., Li H. and Jones M. G. K. // NCBI Genome Project Unpublished. – 2013.
226. Xie Z., Johansen L. K., et. al. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. // PLoS Biol. – 2004. – V. 2(5) – P. e104.
227. Yamasaki S., Sakai J., Fuji S., Kamisoyama S., Emoto K., Ohshima K. Comparisons among isolates of sweet potato feathery mottle virus using complete genomic RNA sequences. // Arch.Virol. – 2010. – V. 155 – P. 795-800.
228. Yamashita K., Sakai J. and Hanada K. Characterization of a New Virus from Garlic (*Allium sativum* L.), Garlic Mite-borne Mosaic Virus. // Ann. Phytopathool. Sooc. Jpn. – 1996. – V. 62 – P. 483-489.
229. Yanbin Y., Fischer D. Identification and investigation of ORFans in the viral world. // BMC Genomics. – 2008. – V. 19 – P. 9-24.
230. Ye K., Malinina L., and Patel D. J. Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. // Nature. – 2003. – V. 426 – P. 874-878.
231. Yelina N. E., Savenkov E. I., Solovyev A. G., Morozov S. Y., and Valkonen J. P. Long-distance movement, virulence, and RNA silencing suppression controlled by a single protein in hordei- and potyviruses: complementary functions between virus families. // J. Virol. – 2002. – V. 76 – P. 12981-12991.
232. Yin Y, Fischer D. Identification and investigation of ORFans in the viral world. // BMC Genomics. – 2008. – V. 19 – P. 9:24.
233. Yu B., Yang Z., Li J., Minakhina S., Yang M., Padgett R. W., Steward R., and Chen X. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. // Science. – 2005. – V. 307 – P. 932-935.
234. Yu D., Fan B., MacFarlane S. A., Chen Z. Analysis of the involvement of an inducible Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. // Mol Plant Microbe Interact. – 2003. – V. 16 – P. 206-216.

235. Zamore P. RNA interference: listening to the sound of silence. // Nat. Struct. Biol. – 2001. – V. 8 – P. 746-750.

236. Zavriev S. K., Vishnichenko V. K. Allexiviruses. In Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Marc H.V. van Regenmortel, Claude M. Fauquet, Dave H.L. Bishop, E. B. Carsten, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, R. B. Wickner // Academic Press; 1st edition. – 2000 – P. 981-984.

237. Zhang H., Kolb F. A., Brondani V., Billy E., and Filipowicz W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. // Embo J. – 2002. – V. 21 – P. 5875-5885.

238. Zilberman D., Cao X., Jacobsen S. E. ARGONAUTE4 control of locuss-pecific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. // Science. – 2003. – V. 299 (5607) – P. 716-719.