

**УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ ПО МАГИСТЕРСКОЙ
ПРОГРАММЕ ФЕН НГУ
«ГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ»**

чл.-корр. РАН, д.б.н. А.В. Кочетов

Содержание:

1. Состояние и перспективы использования маркер-ориентированной и геномной селекции растений	2
2. Трансгенные растения как генетические модели для изучения функций генов растений	9
3. Вирус-индуцируемый сайленсинг как метод изучения функций генов высших растений	16
4. Вироид веретеновидности клубней картофеля - как пример генетических механизмов, лежащих в основе вирулентности и патогенеза	23
5. Нематоды - примеры генетических механизмов, лежащих в основе устойчивости растений и развития новых высокопатогенных изолятов нематод	29
Литература	36

Новосибирск

2022

1. Состояние и перспективы использования маркер-ориентированной и геномной селекции растений

Переход человека к оседлому образу жизни, произошедший около 10 тыс. лет тому назад, был связан с domestикацией (одомашниванием), то есть введением в культуру растений и животных. Из сотен тысяч диких видов растений человек ввел в культуру около 150, из них основных продовольственных – около 50.

Доместикация осуществлялась эмпирически: из естественного природного разнообразия отбирались семена наиболее продуктивных форм растений по их внешним особенностям, называемым фенотипическими признаками. Сегодня можно понять, какие генетические механизмы лежали в основе domestикации. Так, у диких форм томата ген *Fruitweight 2.2* тормозит рост плода и это является важным адаптивным признаком. Древние земледельцы, отбирая растения с крупными плодами, фактически вели отбор мутантных вариантов этого гена, которые активировались на более поздней стадии развития плода, что позволяет ему достичь большего размера (рис. 1, сверху). Или, например, кукуруза была создана более 7 тыс. лет до н.э. на основе вида-предшественника – теосинте. В ходе отбора на повышение продуктивности были получены формы с аллельными вариантами генов, обеспечивших увеличение числа зерен в початке и многократное увеличение его размеров (рис. 1, внизу). Морфологические изменения, важные для domestикации других растений, также возникали вследствие мутаций в единичных генах. Вводя в культуру такие мутантные, приспособленные для возделывания формы растений, человек впервые использовал искусственный отбор.

1.1 Отбор и комбинационная селекция

На протяжении столетий возделывания растений человек продолжал вести отбор, оставляя в качестве семенного материала для будущих посевов лучшие, в первую очередь по продуктивности, экземпляры. Однако такой тип отбора (массовый отбор) рано или поздно перестает быть эффективным. Важнейшим этапом совершенствования селекции стало введение предложенного в XIX в. метода индивидуального отбора, основанного на получении семян от отдельных лучших растений и дальнейшей работе с ними. Это резко повысило результативность селекции и позволило выявлять лучшие генетические варианты в пределах одного вида. Позже широкое применение получил метод комбинационной селекции, основу которого составляет скрещивание форм, различающихся по отдельным важным признакам или их сочетаниям. Селекционеры получили возможность не только находить лучшие генотипы, но и создавать их в процессе гибридизации и дальнейшего отбора требуемых комбинаций родительских генов.

В рамках этого подхода академик П.П. Лукьяненко широко привлекал к скрещиванию сорта отдаленного эколого-географического происхождения, в результате чего в 1959 г. в Краснодарском НИИ сельского хозяйства была создана знаменитая среднерослая озимая пшеница Безостая-1, обладающая устойчивостью к полеганию. Позднее методами молекулярной генетики удалось показать, что за устойчивость к полеганию отвечают гены короткостебельности, *Rht* (*reduced height*). Это свойство открыло путь к увеличению веса колоса и, следовательно, к достижению выдающейся продуктивности. Сорт Безостая-1 характеризовался и другими ценными качествами, что в результате обеспечило его успех. Феномен Безостой-1 активно изучали генетики всего мира, и сегодня большинство генов, контролируемых хозяйственно ценными признаками этого сорта, известны и описаны в мировом каталоге генных символов пшеницы.

Параллельно в этом же направлении работал мексиканский генетик и селекционер Н. Борлоуг, создавший высокоурожайные сорта пшеницы с коротким стеблем, то есть устойчивые к полеганию. Короткостебельность была привнесена в мексиканские сорта за

счет скрещивания с низкорослым японским сортом Норин-10. Сегодня большинство озимых пшениц в мире имеет сочетание генов короткостебельности, высокой урожайности, а также устойчивости к изменению фотопериода, что позволяет возделывать их в разных широтах. На основе этих сортов производство пшеницы в ряде стран мира выросло в 3-5 раз, в связи с чем Н. Борлоуга называют отцом «зеленой революции».

В настоящее время методы комбинирования генов и отбора составляют основу для выведения новых высокопродуктивных сортов ряда видов культурных растений. Например, под руководством академика Л.А. Беспаловой в Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко и под руководством академика Б.И. Сандухадзе в Московском НИИСХ «Немчиновка» создаются выдающиеся по продуктивности и другим хозяйственно-ценным признакам сорта озимой пшеницы.

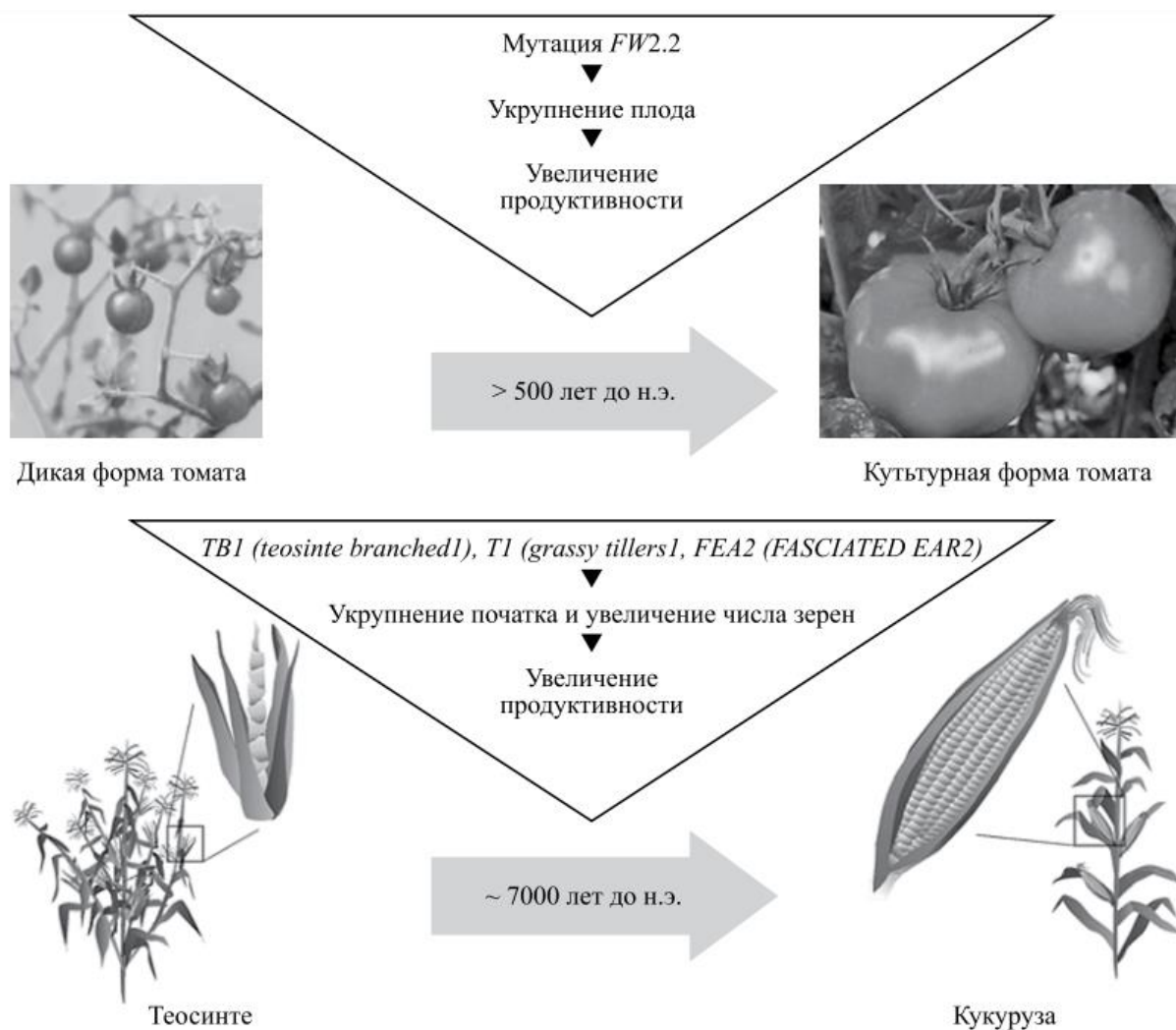


Рис. 1. «Гены доместикации» томата и кукурузы

Вверху – у диких форм томата ген *FW2.2* (*Fruitweight 2.2*) останавливает деление клеток плода (негативный регулятор роста); мутантные варианты этого гена, отобранные в ходе доместикации, активируются на более поздних стадиях развития, благодаря чему плод успевает достичь более крупных размеров; Внизу – мутации в генах *TBI* (*teosinte branched1*) и *GT1* (*grassy tillers1*) вызвали изменение архитектуры растения (исчезновение боковых побегов, уменьшение числа початков), а мутация *FEA2* (*fasciated ear2*) привела к многорядности початка; эти мутации в итоге способствовали увеличению продуктивности кукурузы.

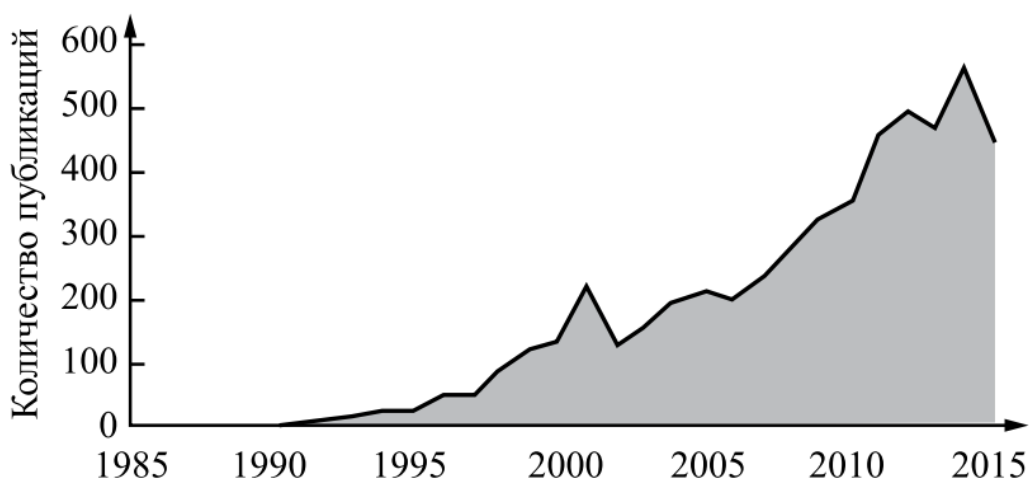


Рис. 2. Динамика публикационной активности по использованию ДНК маркеров в растениеводстве (www.scopus.com, данные на 01.11.2016 г.)

1.2 Гибридная селекция

Важным достижением, имеющим прорывное значение для селекции растений, стало открытие в первой половине XX в. явления гетерозиса – более высокой жизнеспособности и продуктивности гибридов первого поколения по сравнению со скрещиваемыми формами. Это открытие способствовало появлению нового научного направления – гибридной селекции (рис. 2). Метод был успешно внедрен у одних видов (кукуруза, сорго, сахарная свекла, томат и др.), но затруднен у других (например, пшеница, ячмень). Накопив новые знания в области генетики этих культур и разработав новые технологические решения, генетики и селекционеры вновь вернулись к идее внедрения метода гетерозиса в селекционный процесс для повышения их продуктивности. Например, уже к 2012 г. посевы гибридной пшеницы в Европе достигли 250 тыс. га. Доля посевов гибридных форм “классических” объектов гибридной селекции – кукурузы, подсолнечника и сорго – составляет 65, 60 и 48% соответственно, а некоторые овощные культуры сейчас практически на 100% представлены гибридными формами.

1.3 Хромосомные и клеточные технологии в селекции

Мутагенез. Комбинационная и гибридная селекция основаны на имеющемся природном разнообразии того или иного вида культурных растений, которое имеет свои пределы. Доместикация растений приводила к избирательному культивированию пригодных для возделывания форм и, как следствие, сохранению лишь узкой части природного генетического разнообразия (эффект “бутылочного горлышка”). Дальнейший многовековой отбор сельскохозяйственных растений также способствовал сужению генетического разнообразия и утрате некоторых адаптивных свойств. Однако климатические условия со временем изменялись и появлялись новые агрессивные формы фитопатогенов и фитофагов. Для повышения устойчивости культурных растений к фитопатогенам еще в 30-40-е годы XX в. исследователи стали прибегать к различным способам расширения генетического разнообразия культурных видов за счет использования потенциала их дикорастущих сородичей.

Отдаленная гибридизация с родственными видами из генетических коллекций существенно расширяет потенциал генетической изменчивости, позволяя включать в селекцию новые гены устойчивости к неблагоприятным факторам окружающей среды и

фитопатогенам, а также морозостойкости. Наш соотечественник академик Н.В. Цицин впервые получил пшенично-пырейный гибрид, скрестив пшеницу с пыреем, и заложил в СССР основы технологии отдаленной гибридизации. Озимая пшеница на основе пшенично-пырейных гибридов обладает морозостойкостью, что позволяет возделывать ее не только на юге России, но и, например, в Московской области и даже Красноярском крае, для которого характерен резко континентальный климат и суровые зимы. Обширные площади там занимает современный сорт озимой пшеницы Новосибирская-51. Как и другие сибирские озимые сорта, он ведет свое начало от пшенично-пырейных гибридов, созданных в 1970-е годы последователем Н.В. Цицина – сотрудником Института цитологии и генетики СО АН СССР В.М. Чекуровым.

Для повышения изменчивости и получения новых полезных вариантов генов также использовались методы радиационного и химического мутагенеза. Яркий пример успешного перевода исследований по мутагенезу в практическую плоскость – создание высокоурожайного, с отличными хлебопекарными качествами сорта яровой мягкой пшеницы Новосибирская-67, экономический эффект от внедрения которого, кстати сказать, многократно превысил затраты на строительство Института цитологии и генетики СО АН СССР, в котором он был выведен.

Для улучшения сортов культурных растений может использоваться не только потенциал ядерных генов других видов, но и изменчивость ядерно-цитоплазматических взаимодействий. Это можно осуществить через создание так называемых аллоплазматических интрогрессивных генотипов. Создание таких генотипов, несущих чужеродную цитоплазму и участки чужеродных хромосом, – область хромосомной инженерии, основной метод которой – скрещивание (гибридизация) представителей разных видов (родов) растений. В качестве недавнего примера успешного использования методов хромосомной инженерии для решения практических задач приведем полученный на основе ячменно-пшеничной аллоплазматической интрогрессивной линии сорт яровой мягкой пшеницы Сигма (зарегистрирован в 2016 г., патентообладатели – СибНИИСХ, Омск, и ИЦиГ СО РАН, Новосибирск), высокоурожайный, с хорошими хлебопекарными качествами и устойчивостью к бурой ржавчине.

Маркер-ориентированная и геномная селекция. Несмотря на огромные успехи классической селекции, следует подчеркнуть, что создание новых сортов на основе этого подхода занимает в среднем 12-15 лет. Процесс трудозатратен, так как ведется эмпирически за счет огромного числа скрещиваний и многолетних полевых испытаний. При этом требуется постоянная смена сортов, потому что существующие могут терять устойчивость к заболеваниям как из-за эволюционного возникновения новых рас фитопатогенов, так и из-за распространения фитопатогенов на новые территории. Потребность в новых сортах вызвана также меняющимися климатическими условиями и запросами рынка, которые определяются, например, распространением функционального и диетического питания. В связи с этим необходима разработка отечественных селекционно-генетических технологий, существенно повышающих скорость выведения новых высокопродуктивных сортов сельскохозяйственных культур.

Одним из эффективных подходов к решению этой задачи является маркер-ориентированная селекция. Суть ее состоит в использовании диагностических ДНК-маркеров – участков геномной ДНК, расположенных внутри нужного варианта гена или в непосредственной близости от него. Если селекционер определил наличие такого маркера в геноме растения, он может использовать это растение для своей работы. Каковы же преимущества маркер-ориентированной селекции? Во-первых, она существенно ускоряет процесс выведения нового сорта, так как нет необходимости тратить время на выращивание большого количества растений и анализ их фенотипов по целевым признакам. Во-вторых, экономятся ресурсы за счет включения в селекционный процесс минимального количества растений, поскольку происходит выбраковка тех, у которых отсутствуют нужные комбинации маркеров. Наконец, повышается направленность и точность селекционного

процесса, потому что идентификация генов не осложняется влиянием окружающей среды, неизбежным при полевых оценках. Не менее важна возможность получения форм с заданными комбинациями генов, например, комбинациями генов устойчивости. Оценка растений на устойчивость к заболеваниям в полевых условиях не всегда возможна, так как инфекционные заболевания проявляются не каждый год (а лабораторная оценка с искусственным заражением – дорогостоящая и трудоемкая процедура), поэтому использование для отбора растений молекулярных маркеров существенно сокращает время создания сортов с мультипатогенной устойчивостью.

На рисунке 2 приведены данные по количеству публикаций по ДНК-маркерам в растениеводстве. Как видим, с 1990-х годов интерес исследователей к этой теме резко возрос. Маркер-ориентированная селекция показала себя не только как современная высокоэффективная модификация селекции комбинационной, использующей внутривидовую изменчивость, но и как полезный инструмент, с помощью которого в процесс создания нового сорта вовлекается генетический потенциал дикорастущих сородичей. Фрагменты их геномов, введенные за счет отдаленной гибридизации в геномы культурных видов, легко идентифицировать с помощью ДНК-маркеров, расположенных в этих участках хромосом. В России первые исследования по использованию методов маркер-ориентированной селекции были выполнены на пшенице в 2009 г. и позднее легли в основу успешного внедрения этого подхода в отечественном растениеводстве. Пример – совместная работа ИЦиГ СО РАН и Челябинского НИИСХ по созданию мягкой пшеницы, обладающей стабильной устойчивостью к бурой и стеблевой ржавчине, а также к мучнистой росе. Диагностические ДНК-маркеры полезны и при оценке потенциальных родительских форм для гибридной селекции. Таким образом, потенциал классических подходов – комбинационной и гибридной селекции – усиливается, благодаря использованию методов ДНК-диагностики.

Среди технологий, играющих в настоящее время решающую роль в ускорении селекционного процесса, назовем и метод удвоенных гаплоидов. С помощью этой технологии можно в кратчайшие сроки получать диплоидные (дигаплоидные) растения, характеризующиеся полной гомозиготностью, то есть идентичностью генов в гомологичных хромосомах. Ценность таких растений заключается в однородности их потомства. Традиционным способом – с помощью самоопыления – однородности (не совсем полной) можно достичь лишь через 8-9 поколений.

Следует подчеркнуть, что многие практически значимые признаки растений (урожайность, количество семян в колосе, вес зерна и др.) входят в разряд количественных, и их выраженность контролируется очень большим числом генетических локусов. Для отбора по таким локусам в последние годы начал применяться метод геномной селекции. В этом случае у растений, находящихся в селекционном эксперименте, выявляют распределенные по геному варианты генов, вносящие наибольший вклад в проявление количественного признака, и отбирают те растения, которые содержат максимальное число таких генов. Экспериментальная часть работы осуществляется путем прямого секвенирования выборочных фракций генома либо с помощью ДНК-микрочипов. Полученная информация (относящаяся к классу big data и предполагающая очень большие ее объемы) анализируется с помощью методов биоинформатики, требующих высокопроизводительных вычислений. Высокая эффективность геномной селекции привела к тому, что появилась необходимость массовой расшифровки геномов сельскохозяйственных растений, для чего используются методы высокопроизводительного секвенирования. Уже отсеквенированы геномы более 20 культивируемых видов, заканчивается расшифровка большого и сложного генома самого практически значимого вида — мягкой пшеницы. В этой работе в составе международного коллектива принимают участие представители ИЦиГ СО РАН и ФИЦ Биотехнологии РАН (<http://www.wheatgenome.org/About/Members>).

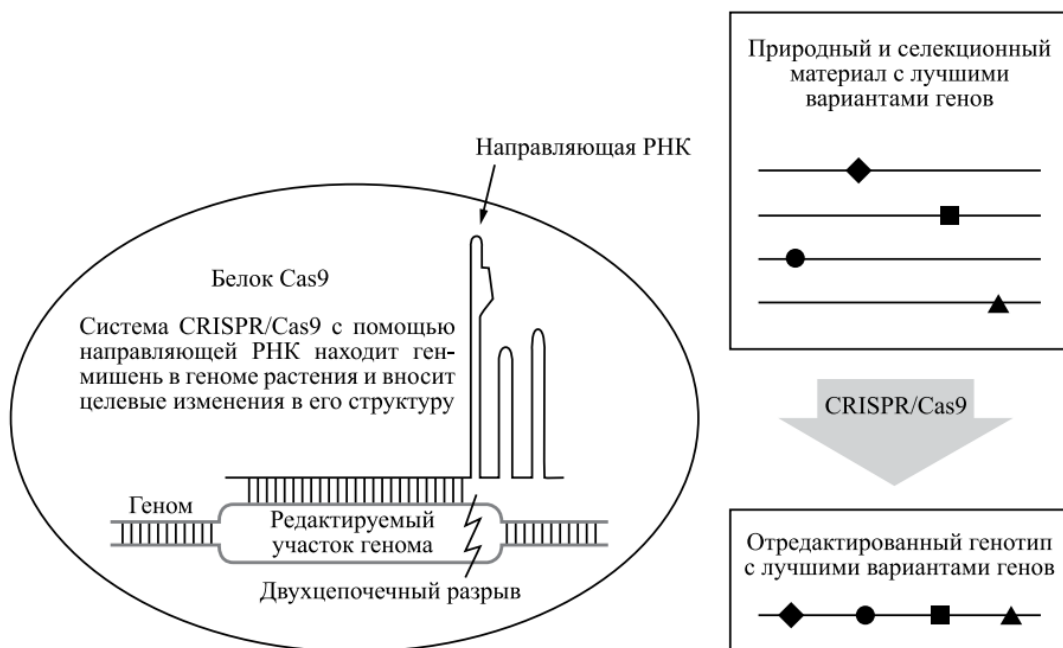


Рис. 3. Геномное редактирование (система CRISPR/Cas9): имитация природных мутаций Система позволяет одновременно вносить несколько мутаций в выбранный участок генома и получать нетрансгенные растения с заданными свойствами. Типы вносимых изменений: нокаут гена, замена одного нуклеотида, встройка гена, делеция участка хромосомы. Первые работы на растениях с использованием CRISPR/Cas9 были опубликованы в 2013 г.

1.4 Феномика

Еще один важнейший инструмент технологического оснащения процесса селекции – автоматическое фенотипирование растений. Между производительностью геномного анализа и описанием свойств растений в процессе селекции существует большой технологический разрыв. В то время как легко поддающиеся автоматизации методы геномного анализа обеспечивают быструю идентификацию генотипа растений, эффективность селекции лимитируется трудоемким ручным анализом фенотипа. В связи с этим разрабатывается целый спектр методов быстрого, точного и массового описания фенотипов растений как в полевых, так и лабораторных условиях, которые базируются на информационных технологиях и оригинальных инженерных решениях. К ним относятся мобильные средства для полевого анализа растений с автоматическим вводом информации в базы селекционных данных, автоматизированный анализ фенотипа растений в теплицах, крупномасштабное фенотипирование посевов с помощью беспилотных летательных аппаратов, оборудованных мультиспектральными камерами, и многие другие. Некоторые из этих методов разрабатываются российскими институтами.

Прорывные технологии геномного редактирования. Буквально в последние несколько лет появились новые революционные технологии геномного редактирования, которые позволяют вносить в выбранные участки геномов целевые мутации. На рисунке 3 приведена самая современная из систем редактирования – CRISPR/ Cas9. С помощью специальной “направляющей” РНК эта система находит ген-мишень в геноме растения и вносит целевые изменения в его структуру (такие как нокаут гена, замена одного или нескольких нуклеотидов, встройка или делеция участка хромосомы). CRISPR/Cas9 способна одновременно вносить несколько мутаций в выбранный участок генома, поэтому в одном генотипе можно скомбинировать лучшие варианты генов, которые в природном и селекционном материале “разбросаны” по разным генотипам. Причем комбинировать

полезные гены в одном растении можно не путем долгих скрещиваний, а с помощью быстрого редактирования генома. Это своего рода имитация природных мутаций, фиксирующихся в геномах растений в ходе их эволюции или селекции, что позволяет получать нетрансгенные растения с заданными свойствами.

В последние три года резко возросло число опубликованных работ, авторы которых сообщают об успешном редактировании генома растений, в том числе основных возделываемых видов (картофель, капуста, томат, кукуруза, рис, пшеница, ячмень, соя, сорго). Работы демонстрируют возможность получения с помощью системы CRISPR/ Cas9 нетрансгенных растений со специфическими заданными мутациями, стабильно наследуемыми в поколениях. Эта возможность открывает перспективу для выведения сортов с заданными моно- и олигогенными признаками. Пока идет дискуссия, можно ли модифицированные формы, полученные путем редактирования одного или нескольких нуклеотидов и не несущие в себе трансгенных конструкций, ставить в один ряд с традиционными ГМО, отечественные исследователи взяли на вооружение эту технологию для проведения лабораторных исследований по получению новых улучшенных форм растений с заданными свойствами. Такие работы выполняются в МГУ им. М.В. Ломоносова, ИЦиГ СО РАН, ФИЦ Биотехнологии РАН и ряде других научных организаций.



Рис. 4. Основные вехи, связанные с появлением новых прорывных технологий в процессе селекции.

Как видно из рисунка 4, временной интервал между событиями, связанными с появлением новых селекционно-генетических технологий, стремительно сокращается. Практически ежегодно селекционеры получают новые инструменты для улучшения генотипа растений. Однако реализация генетического потенциала каждого сорта критически зависит от условий его выращивания, задаваемых сортовой агротехнологией. Если в Западной Европе генетический потенциал реализуется на 90%, то в России ситуация иная: например, для картофеля – всего лишь около 30%. Это значит, что в руках российских сельхозпроизводителей, помимо селекции, может присутствовать еще один ключ к

существенному повышению продуктивности – эффективные сортовые технологии, требующие организации производства современной отечественной сельскохозяйственной техники для семеноводства, разработки рациональных способов обработки почв и создания экологически безопасных средств защиты, биобезопасных стимуляторов роста и развития растений и многого другого.

Вопросы:

- 1) Кратко описать базовые методические подходы селекции (массовый отбор, комбинационная селекция, индивидуальный отбор), а также их роль в процессе происхождения человека разумного (доместикация растений через призму генетики).
- 2) Какова роль гетерозиса в современной агрогенетике?
- 3) Привести примеры отдаленной гибридизации для интрогрессии полезных генов и признаков устойчивости и качества.

2. Трансгенные растения как генетические модели для изучения функций генов растений

Первые линии трансгенных растений были получены более тридцати лет назад с помощью векторной системы, основанной на *Agrobacterium tumefaciens*. За минувшие три десятилетия технологии получения трансгенных растений стали общепринятым способом исследования функций отдельных генов и их систем, а также проложили путь для получения сортов с новыми ценными свойствами для нужд сельского хозяйства и биотехнологических производств. Использование трансгенных форм для проведения исследований можно косвенно оценить по количеству научных публикаций, в названии или аннотации которых наряду с названием растения присутствуют термины *transgene* или *transgenic*. Этот подход широко применялся для работ не только с классическими «модельными» растениями (*Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*), но и с важнейшими сельскохозяйственными культурами:

Вид растения	Кол-во статей*
Любое растение (термин plant)	26 222
<i>Arabidopsis thaliana</i>	7 983
<i>Nicotiana tabacum</i> (tobacco)	6 443
<i>Solanum tuberosum</i> (potato)	1 450
<i>Triticum aestivum</i> (wheat)	1 016

* Аннотированы в системе PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), август 2016 г.

Классическая схема получения трансгенных растений приведена на рис. 5. Планирование создания трансгенных растений включает разработку схемы генетической конструкции, структура которой обусловлена видом растений и способом трансформации. Эффективность трансформации зависит не только от вида растений, но и от генотипа и может в значительной степени варьировать у разных сортов. Для трансформации

двудольных растений обычно используют разоруженные штаммы *Agrobacterium tumefaciens*, однако агробактериальная трансформация многих видов однодольных растений затруднена, и в этом случае применяют другие методы, например бомбардировку частицами с сорбированной на них ДНК генетической конструкции с последующим отбором каллусов на селективных фонах и регенерацией трансгенных растений. Для агробактериальной трансформации используют бинарные векторы, способные реплицироваться и в *Escherichia coli*, и в агробактерии. *A. tumefaciens* переносит в геном растений сегмент ДНК (Т-область), расположенный между концевыми повторами (LB, RB). В структуре Т-области генетической конструкции можно выделить два ключевых элемента (см. рис. 5): репортерный ген для отбора трансформантов на селективных средах и собственно целевой генетический элемент для экспрессии в клетках растения, ради которого и проводится эксперимент по получению и анализу трансгенных форм. В качестве такого целевого элемента могут использоваться белок-кодирующие гены, гены микроРНК, сегменты генов-мишеней для синтеза антисмысловых или самокомплементарных (двухцепочечных) РНК. Важное значение имеют служебные элементы (промотор, поли(А)-сигнал, трансляционные энхансеры), а также адаптация структуры чужеродной ДНК для правильной экспрессии в клетках растений (сайты инициации и терминации трансляции, вторичная структура в 5'-нетранслируемом районе, в некоторых случаях – оптимизация кодонного состава для максимизации уровня экспрессии).

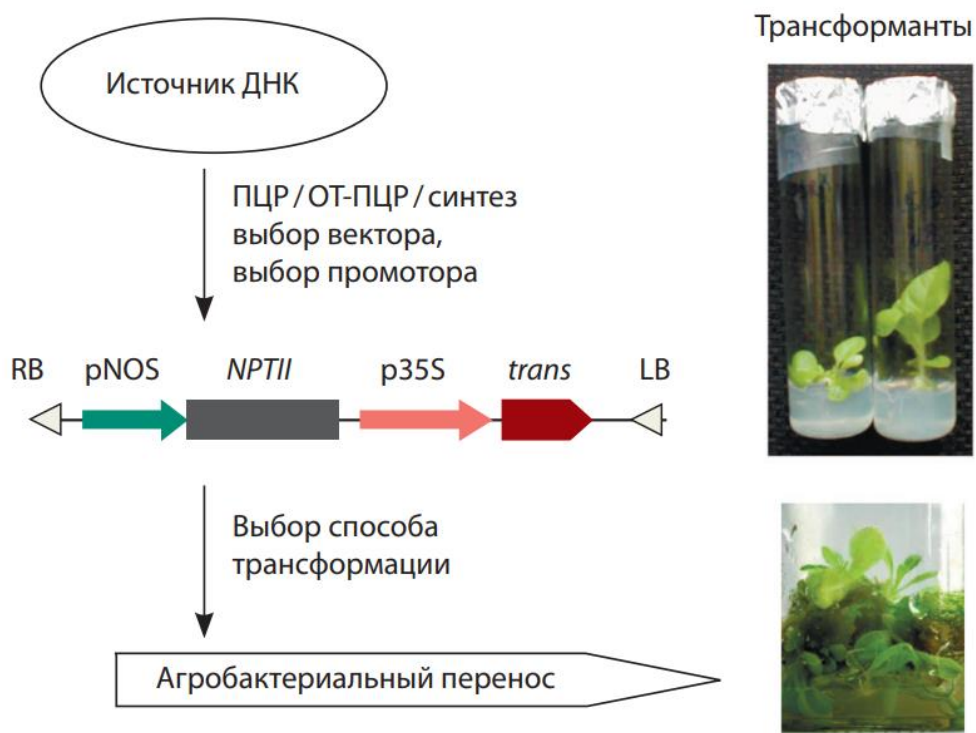


Рис. 5. Классическая схема получения трансгенных растений.

ПЦР – полимеразная цепная реакция; ОТ – обратная транскрипция; синтез – синтетические сегменты ДНК; RB, LB – концевые повторы, окаймляющие Т-область в бинарном векторе; *NPTII* – ген неомицинтрансферазы II *E. coli*, один из вариантов репортерного гена, обеспечивающий отбор трансгенных растений на селективных средах; pNOS – промотор гена нопалинсинтазы *A. tumefaciens*; p35S – промотор гена 35S РНК вируса мозаики цветной капусты; *trans* – трансген или антисмысловый сегмент/ инвертированный повтор для супрессии гена-мишени с помощью РНК-интерференции. Агробактериальный перенос осуществляется с помощью «разоруженных» штаммов *A. tumefaciens*, Т-области Ti-плазмиды которых делетированы, и в геном клетки растения переносится Т-область из бинарного вектора. В качестве примера приведены фотографии канамицин-устойчивых трансформантов *Nicotiana tabacum*.

Важнейший этап планирования генетической конструкции – выбор промотора. На ранних этапах развития генной инженерии применялся ограниченный круг промоторов вирусного или агробактериального происхождения (35 S, pNOS, pMAS), а также промоторы высокоэкспрессирующихся генов (актина, убиквитина, тубулина). Однако для решения поставленных в эксперименте задач может требоваться экспрессия трансгена, ограниченная определенной тканью, периодом развития или внешними условиями (индуцибельные промоторы). Накопление информации о транскриптомах и паттернах экспрессии генов растений (в том числе трансгенов под управлением различных промоторных районов в трансгенных растениях) значительно расширило возможности по дизайну генетических конструкций. В ИЦиГ СО РАН был получен ряд линий трансгенных растений для изучения функций отдельных генов и механизмов генетического контроля фенотипических характеристик, некоторые из которых описаны ниже.

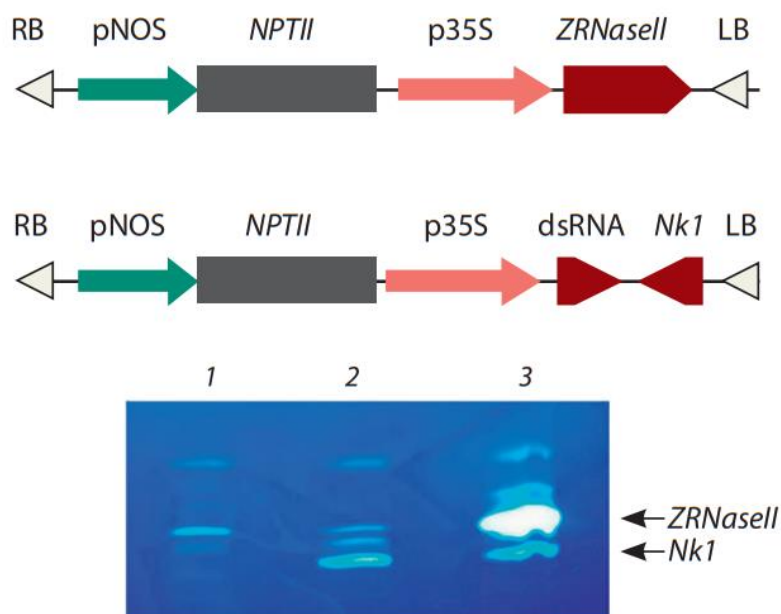
2.1 Линии трансгенных растений с измененным уровнем активности апопластных рибонуклеаз

В геноме растений содержатся гены экстраклеточных рибонуклеаз (РНКаЗ), функции которых традиционно связывали с ремобилизацией фосфатов из отмирающих частей растений (S-подобные РНКаЗы), а также с устойчивостью к фитопатогенным грибам (некоторые белки семейства PR-4). Было выдвинуто предположение о возможной роли РНКаЗ апопласта в устойчивости к вирусам (подавляющее большинство вирусов растений содержат РНК-геномы, которые могут разрушаться рибонуклеазами). Для проверки этого предположения были созданы линии трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, экспрессирующие гены панкреатической РНКаЗы *Bos taurus*, S-подобной РНКаЗы *Zinnia elegans*, а также линии табака с супрессированным геном собственной S-подобной РНКаЗы *Nk1*.

На рис. 6 приведены схемы двух генетических конструкций: для синтеза экстраклеточной РНКаЗы растительного происхождения использована кДНК гена *ZRNaseII* циннии, помещенная под управление сильного конститутивного промотора 35S РНК ВМЦК (см. рис. 6, а); для супрессии гена S-подобной РНКаЗы табака *Nk1* использованы сегменты этого гена, расположенные в виде инвертированного повтора (см. рис. 6, б). Видно, что экспрессия генетических конструкций изменяет спектр активных рибонуклеаз в белковых экстрактах растений в сравнении с исходными (нетрансгенными) формами в заданном направлении (см. рис. 6, в). При этом трансгенные растения и исходный сорт табака не имели видимых различий (см. рис. 6, г).

Для экспрессии гетерологичного гена (секреторной РНКаЗы млекопитающих) использовался другой вариант генетической конструкции, в котором кДНК панкреатической РНКаЗы *Bos taurus* была помещена под управление промотора 2' гена маннопинсинтазы. В отличие от сильного конститутивного промотора 35S ВМЦК, этот промотор характеризовался более низким уровнем экспрессии в норме, а также высоким уровнем локальной индукции в районе повреждения тканей растений. Поскольку вирусы часто попадают в растения с помощью переносчиков-фитофагов, паттерн транскрипции промотора 2' был близок к природным вариантам генов защитных белков. Обе конструкции обеспечивали высокий уровень рибонуклеазной активности в апопласте (в 8-15 раз выше, чем у контроля), при этом линии трансгенных растений характеризовались существенной задержкой развития вируса табачной мозаики, а также вируса мозаики огурца, принадлежащих к разным таксономическим группам. Гипотетические механизмы противовирусного действия экстраклеточных РНКаЗ могут быть основаны как на уязвимости геномной РНК вирусов на некоторых этапах их проникновения в растительную клетку, так и на имитации механизма программируемой клеточной смерти: при нарушении целостности тканей содержимое апопласта может проникнуть в цитоплазму поврежденных

клеток, в этом случае активные РНКазы выполняют функции «киллерных» белков, убивающих клетку и предотвращающих репликацию геномной РНК проникшего в нее вируса.



Белки с РНКазной активностью: 1 – растение табака с супрессированным геном *Nk1*; 2 – нетрансгенный контроль; 3 – растение, экспрессирующее трансген *ZRNaseII*



Рис. 6. Трансгенные растения с измененным уровнем экспрессии экстраклеточных рибонуклеаз.

а, б – схемы генетической конструкции: а – для экспрессии кДНК гена S-подобной РНКазы *Zinnia elegans* (*ZRNaseII*); б – дцРНК-супрессора гена S-подобной РНКазы *Nicotiana tabacum* *Nk1*; в – фореграмма белков с РНКазной активностью (в матрике геля содержатся РНК, использован специальный краситель); г – трансгенные (RNS) и нетрансгенные (SR1) растения *N. tabacum*.

Таким образом, результаты анализа вирусоустойчивости трансгенных растений с модифицированным уровнем РНКазной активности в апопласте позволили сделать заключение, что эти белки могут формировать «нуклеазный» барьер для РНК-вирусов и

рассматриваться как элементы неспецифической системы защиты, сходные по паттерну экспрессии и некоторым функциям с PR-белками (pathogenesis-related proteins). Помимо информации общенаучного характера, на основе полученных данных можно разработать новые способы получения сортов сельскохозяйственных растений с повышенным уровнем неспецифической устойчивости к вирусам. Для этого возможно использовать трансгены экстраклеточных РНКаз, а также генотипы с высокой РНКазной активностью в апопласте, отобранные после анализа их генетической изменчивости по указанному признаку. В настоящее время увеличение уровня базовой (неспецифической) устойчивости к фитопатогенам в комбинации с направленным увеличением специфической устойчивости рассматривается как одно из наиболее перспективных направлений селекции.

2.2 Линии трансгенных растений со сниженным уровнем экспрессии гена пролиндегидрогеназы

В клетках многих видов растений пролин выполняет функции совместимого осмолита, и изменения в его содержании важны для быстрой адаптации растений к изменению в режиме водоснабжения. Кроме этого, согласно некоторым данным, пролин способен инактивировать свободные радикалы и защищать белки и мембраны растительных клеток от повреждений. Считалось, что пролин может синтезироваться из глутамата, скоростью-лимитирующим ферментом его синтеза служит пирролин-5-карбоксилатсинтаза (П5КС). Функции гена П5КС у разных видов растений активно исследовались, в том числе на модели трансгенных растений. Однако функции генов катаболизма пролина, в частности скорость-лимитирующего гена пролиндегидрогеназы (ПДГ), изучены в значительно меньшей степени.

Для определения вклада гена ПДГ в контроль стрессо-устойчивости растений были разработаны трансгенные формы табака со сниженным уровнем его экспрессии (рис. 7). В составе генетической конструкции был использован короткий антисмысловой сегмент гена ПДГ арабидопсиса (см. рис. 7, а), что привело к частичной супрессии гена ПДГ, снижению активности фермента в два раза и к умеренному повышению активности пролина в норме (см. рис. 7, б). Анализ морфофизиологических характеристик растений показал, что трансгенные формы не имели видимых отличий от исходного сорта *Nicotiana tabacum* SR1, однако характеризовались увеличенным уровнем устойчивости к засухе, холоду, токсичным солям тяжелых металлов (см. рис. 7, в). В целом частичная супрессия гена ПДГ приводила к заметному сдвигу нормы реакции по признакам устойчивости к разным абиотическим стрессам. Трансгенные формы растений подсолнечника и кукурузы, полученные с помощью этой же генетической конструкции, также отличались повышенной выживаемостью в условиях дефицита воды и засоления, что говорит о консервативной роли гена ПДГ в контроле стрессоустойчивости.

По-видимому, полученные результаты можно объяснить свойством пролина защищать молекулы белков от повреждений. При резком изменении условий окружающей среды (водоснабжение, повышение или понижение температуры и т. п.) у растений индуцируется экспрессия генов стрессового ответа, запускающих комплекс адаптационных процессов. В случае интенсивного стрессового воздействия без периода акклиматизации белки клеточного аппарата экспрессии могут быть повреждены, и своевременный синтез защитных белков не будет запущен. Трансгенные формы со сниженным уровнем активности ПДГ характеризуются умеренно повышенным содержанием пролина в норме, что дает определенные преимущества на самых ранних этапах стрессового воздействия, в частности обеспечивает защиту факторов аппарата транскрипции и трансляции и синтез защитных белков, с помощью которых происходит дальнейшая адаптация клеток растений на биохимическом и физиологическом уровнях. Трансгенные растения оказались более устойчивыми к солям тяжелых металлов, токсическое действие которых во многом связано

с повреждением молекул белков (см. рис. 7, в), что может рассматриваться как подтверждение этой гипотезы. В последние годы происходит переосмысление роли метаболической цепи синтеза пролина в процессах, протекающих в растении, и появляется большое количество новых данных о роли этой аминокислоты в формировании гаметофита, контроле старения растений, защите от фитопатогенов и других ключевых процессах. Разработанные нами линии трансгенных растений также могут быть востребованы в качестве генетических моделей для исследования в указанных направлениях.

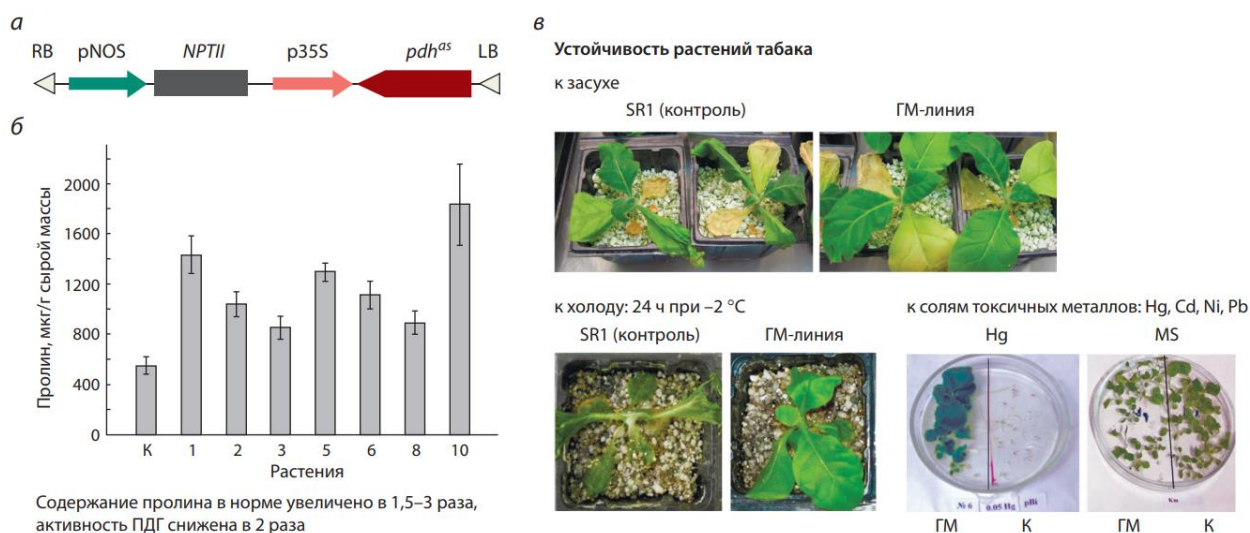


Рис. 7. Трансгенные растения со сниженным уровнем экспрессии гена пролиндегидрогеназы.

а – схема генетической конструкции для частичной супрессии гена пролиндегидрогеназы растений (*pdh^{as}* – антисмысловой сегмент гена *A. thaliana*); б – содержание пролина в листьях трансформантов; в – устойчивость трансформантов (ГМ-линии растений) по отношению к засухе, холоду, а также солям тяжелых металлов.

Важное значение имеет структура генетической конструкции, в которой в качестве антисмыслового супрессора был использован короткий сегмент кДНК гена арабидопсиса. Гетерологичный антисмысловой супрессор не приводил к полному выключению гена ПДГ в растениях *N. tabacum* (и, возможно, кукурузы), поэтому морфологические характеристики и сроки развития трансгенных форм в норме не имели значимых различий с исходным сортом, по крайней мере в условиях теплицы и в экспериментах *in vitro*. Выявленные закономерности можно использовать для получения новых сортов сельскохозяйственных растений с повышенной неспецифической устойчивостью к абиотическим стрессам, для чего могут применяться как методы трансгенеза, так и анализ имеющейся в популяциях генетической изменчивости по активности гена ПДГ/содержанию пролина в норме с последующим вовлечением отобранных генотипов в селекционный процесс с помощью методов маркер-ориентированной селекции.

2.3 Другие методы генной инженерии для изучения генетического контроля признаков растений

В последние годы арсенал генно-инженерных технологий существенно расширился. К числу наиболее интересных технологий относится вирус-индуцируемый генетический

сайленсинг (virus-induced gene silencing – VIGS), основанный на включении сегмента гена растения-хозяина в состав вирусного генома для индукции РНК-интерференции и выключения экспрессии гена-мишени на посттранскрипционном уровне. Эффект от применения VIGS сходен с эффектом, наблюдаемым у трансгенных растений, несущих генетические конструкции с антисмысловыми или дцРНК-супрессорами (см. рис. 6, б и 7, а). Однако получение трансгенных форм для некоторых видов растений представляет собой сложную процедуру. Кроме того, супрессия некоторых генов может блокировать развитие растений, поэтому получение таких трансгенных форм невозможно. VIGS позволяет выключить экспрессию гена-мишени в большинстве клеток взрослого (нетрансгенного) растения, что предоставляет дополнительные возможности в эксперименте. Технически для индукции VIGS используют агробактериальную трансфекцию (внесение суспензии *A. tumefaciens* в ткань листа). В составе Т-области генетической конструкции под управлением растительного промотора расположена кДНК растительного вируса (как правило, нетрансмиссивный вариант, инфицирующий большинство тканей экспериментального растения, но не способный передаваться другому растению обычным для данного вируса способом). В состав этой кДНК включают сегмент гена-мишени, что приводит к индукции РНК-интерференции. Одним из наиболее часто и широко используемых вариантов является векторная система, основанная на вирусе погремковости табака.

В качестве примеров применения VIGS можно привести недавние работы по изучению транскрипционных факторов, контролирующих устойчивость к засухе и фузариозу: анализ последствий «выключения» экспрессии гена в клетках взрослого растения используется как часть комплексного процесса исследования, направленного на всестороннее выявление функций целевых генов.

Другой очень интересный генно-инженерный подход – это гетерологичный генетический сайленсинг (host-induced gene silencing – HIGS). Этот подход основан на индукции в растении РНК-интерференции с помощью трансгенеза или VIGS, но используются антисмысловые сегменты не собственных генов растения, а генов взаимодействующих с растением организмов, например патогенных грибов или фитофаго. Оказалось, что siRNA способны проникать в клетки фитофага и запускать эволюционно-консервативный механизм РНК-интерференции. Примером применения этой технологии служат работы по направленной HIGS-опосредованной супрессии важных генов *Puccinia triticina*, *Fusarium oxysporum*, нематод, насекомых.

По-видимому, в ближайшем будущем будут разработаны новые технологии генной инженерии растений для непосредственного воздействия на фитофагов или другие организмы, взаимодействующие с растениями. Недавно был предложен подход, основанный на синтезе в трансгенных растениях автономных репликонов вирусной природы, не способных реплицироваться в клетках растений, но способных инфицировать клетки фитофагов (alien replicon producing organisms – ARPO), что может предоставить новые возможности в области биоконтроля природных популяций различных организмов.

Методы и подходы генной инженерии необходимы для проведения фундаментальных исследований в области генетики растений. Трансгенные формы дают уникальные возможности для выявления функций отдельных генов, межгенных взаимодействий и, в конечном итоге, – для реконструкции сложных ансамблей генов, контролирующих формирование морфологических, биохимических и физиологических характеристик растений и механизмы адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды.

Вопросы:

- 1) Описать применение методов «обратной генетики» для растений.
- 2) Привести примеры генетических конструкций, генов-мишеней и наблюдаемых эффектов.

3. Вирус-индуцируемый сайленсинг как метод изучения функций генов высших растений

Изучение функций отдельных генов высших растений – важная фундаментальная задача. Наиболее часто применяемыми методами изучения функций генов являются антисмысловая супрессия их активности или гиперэкспрессия под управлением сильного промотора, часто вирусного происхождения. Однако оба этих подхода имеют, по крайней мере, один очевидный недостаток: трудоемкость получения трансгенных растений. Этому недостатка лишен метод вирус-индуцированного подавления генов (virus-induced gene silencing, VIGS), в основе которого лежит применение рекомбинантного вирусного вектора, несущего последовательность гена хозяина. Транскрипты эндогенного гена, гомологичные вставкам вирусного вектора, подвергаются деградации в ходе посттранскрипционного подавления генов. VIGS позволяет обойтись без трансформации растений и, следовательно, сокращает время получения результатов.

В настоящее время расшифрованы геномы многих растений, и их количество постоянно пополняется. Так, например, по предварительным оценкам, геном *Arabidopsis thaliana* содержит 25 тыс. генов, кодирующих белки, а геном *Oryza sativa* – 50 тыс. генов. Ключевая задача на данный момент заключается в идентификации функций каждого из этих генов, а также в анализе их взаимодействия между собой. Весьма привлекательным в подобной ситуации представляется применение метода вирус-индуцированного сайленсинга генов как одного из наиболее удобных и мощных методов “обратной” генетики.

Стратегия использования VIGS-анализа находит все более широкое применение в исследовании функций генов растений. В частности, этот метод был использован для эффективного скрининга геномов многих видов: *Nicotiana* spp., *Solanum* spp., *A. thaliana*, *Hordeum vulgare*, *O. sativa*, *Glycine max*, *Papaver somniferum* и др. Молекулярные механизмы VIGS изучены достаточно хорошо, и сейчас основные работы по развитию и совершенствованию данного метода направлены на создание новых вирусных конструкций для различных видов растений, поиск новых генов-репортеров для контроля эффективности метода VIGS, а также на разработку новых эффективных методов инфицирования. Целью данной работы является обобщение имеющейся к настоящему времени информации относительно механизмов и особенностей использования вирус-индуцированного сайленсинга в качестве нового перспективного метода изучения функций генов растений.

3.1 Молекулярные механизмы VIGS

В основе метода вирус-индуцированного сайленсинга генов растений лежит явление РНК-интерференции (RNA interference, RNAi), известное так же как посттранскрипционный сайленсинг генов (posttranscriptional gene silencing, PTGS). Опыт по VIGS-анализу начинается с заражения растения бактерией *Agrobacterium tumefaciens*, которая содержит рекомбинантный вирусный вектор, несущий последовательность гена хозяина. Далее, в ходе PTGS транскрипты эндогенного гена, гомологичные вставкам вирусного вектора, считываются и регистрируются в ядре, а в цитоплазме осуществляется их деградация. Конечным результатом являются фенотипические последствия подавления целевого гена в масштабах всего растения.

К настоящему времени общепринятой является модель, в соответствии с которой механизм посттранскрипционного сайленсинга генов можно представить следующим образом. На первом этапе в результате индукции ферментативной активности DCL-рибонуклеаз (Dicer-like dsRNAses, DCLs), характерных для высших растений и представляющих собой гомологи белка Dicer млекопитающих, происходит деградация двуцепочечных форм РНК (дцРНК). Образование дцРНК при использовании VIGS-

векторов на основе РНК- и ДНК-содержащих вирусов обусловлено транскрипцией экспрессируемой одноцепочечной РНК (оцРНК) под действием вирусной или растительной РНК-зависимой РНК-полимеразы (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP). Гидролитическое расщепление дцРНК, катализируемое DCL, в конечном итоге приводит к образованию коротких двуцепочечных фрагментов, называемых малыми интерферирующими РНК (small interfering RNAs, siRNAs, или siРНК), длиной приблизительно 21-26 нуклеотидов, с 5'-концевой фосфатной группой и одноцепочечным выступом в 2-3 нуклеотида на 3'-конце.

На втором этапе RNAi за счет активности АТФ-зависимой РНК-геликазы происходит разделение обеих цепей образованных ранее siРНК. Одна из цепей (характеризующаяся меньшей термодинамической стабильностью 5'-конца) остается в составе мультибелкового комплекса RISC (RNA-induced silencing complex), где осуществляется ее связывание с мРНК-мишенью. Белок AGO1, являющийся каталитической компонентой комплекса RISC, проявляет эндонуклеазную активность по отношению к мРНК, комплементарной связанному фрагменту siРНК. Комплементарные участку мРНК-мишени одноцепочечные фрагменты siРНК могут быть использованы в качестве праймеров для растительной RdRP, которая достраивает вторую цепь, используя РНК-мишень как матрицу (эффект ограничен расстоянием ~300-500 нуклеотидов в 5'-направлении от сайта первоначального расщепления). В ходе осуществляемой DCL-рибонуклеазой деградации вновь синтезированных дцРНК происходит образование новых siРНК, которые называют вторичными. Таким образом осуществляется амплификация сигнала. Вторичные siРНК в дальнейшем могут не только участвовать в прямой деградации мРНК-мишени в составе RISC, но и транспортироваться между клетками по плазмодесмам в качестве сигнальных молекул. Подобный симпластный транспорт является белок-опосредованным (в частности, достоверно идентифицирован белок, избирательно транспортирующий siРНК длиной 25 нуклеотидов).

3.2 Векторные конструкции для VIGS-анализа в растениях

Для подавления экспрессии генов в растениях с использованием метода VIGS применяют разнообразные генетические конструкции. Разработано более 20 векторных систем, которые были успешно опробованы на различных растениях, как однодольных, так и двудольных. Выбор вируса, который будет использован в качестве основы при разработке новой VIGS-системы, ограничен целым рядом требований. Во-первых, вирус должен вызывать мягкие симптомы поражения, не маскирующие эффект или фенотипические последствия сайленсинга целевого гена. Во-вторых, вирус должен быть патогенен для как можно большего числа видов растений. И, наконец, необходимо учитывать такой фактор, как безопасность рассматриваемого вируса. В соответствии с указанными требованиями, в качестве подходящих инфекционных агентов при разработке новых VIGS-векторов используют представителей родов (таблица) *Hordeivirus*, *Comovirus*, *Bromovirus*, *Tobravirus*, *Cucumovirus*, *Carlavirus*, *Potexvirus*, *Tobamovirus*, *Cheravirus* (РНК-содержащие вирусы), а также *Begomovirus*, *Geminivirus* (ДНК-содержащие вирусы).

Эффективность инфицирования и подавления экспрессии генов для одного и того же вектора в значительной степени зависит от вида исследуемого растения. Первые эксперименты по VIGS-анализу были проведены на модели *N. benthamiana* с использованием векторных конструкций, полученных на основе вируса табачной мозаики (tobacco mosaic virus, TMV) и вируса картофеля X (potato virus X, PVX). В то же время опыты были направлены на разработку новых векторных систем, дающих стабильные и повторяющиеся результаты и пригодных для использования на как можно большем диапазоне видов растений. Так, был разработан вектор на основе вируса погремковости табака (tobacco rattle virus, TRV), который в настоящее время широко применяется для

VIGS-анализа. TRV является патогенным для более 400 видов растений. Геном TRV представлен двумя сегментами (А и В) позитивной оцРНК. В последовательности А-сегмента (~6.8 тн) закодированы три вирусных полипептида: RdRP, транспортный белок MP и 16-кДа цистеин-обогащенный белок (16K), который играет ключевую роль в эффективной аккумуляции TRV. В-сегмент (~4.5 тн) кодирует капсидный белок (coat protein, CP), а также два неструктурных белка, кодирующая последовательность которых в соответствующем VIGS-векторе замещена на область, содержащую либо цитотоксичный ген *ccdB*, фланкированный attR-сайтами рекомбинации, либо множественные сайты клонирования (multiple cloning sites, MCSs). Усовершенствованную систему векторов на основе TRV (YL192 и YL279), разработанных с применением стратегии рекомбинационного клонирования Gateway (“Invitrogen”, США) и содержащих двойной промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (cauliflower mosaic virus, CaMV), успешно используют для исследования функций генов двудольных растений.

Ряд векторов также был разработан для однодольных растений. Векторная система на основе вируса штриховатой мозаики ячменя (barley stripe mosaic virus, BSMV) была использована для VIGS-опосредованного скрининга геномов видов *H. vulgare*, *Triticum aestivum*, *Dasyprum villosum* (*Haynaldia villosa*), *Brachypodium distachyon*, *Zingiber officinale*. Геном BSMV представлен трехсегментной (α , β и γ) оцРНК положительной полярности. Сегмент α (~3.8 тн) кодирует обладающую метилтрансферазной/геликазной активностью субъединицу RdRp. В последовательности β -сегмента (~3.3 тн) закодированы четыре вирусных полипептида: капсидный белок CP и три неструктурных транспортных белка (TGB1, TGB2 и TGB3). Последовательность γ -сегмента (~2.9-3.3 тн) кодирует дополнительную (GDD) субъединицу РНК-зависимой РНК-полимеразы, а также небольшой (17 кДа) цистеин-обогащенный белок γb , который не является обязательным для репликации и транспорта вируса, но существенно воздействует на процесс патогенеза. Система векторов на основе BSMV, содержащих двойной промотор 35S CaMV и MCSs-сайты в некодирующей области, примыкающей к последовательности гена γb , широко используется для исследования функций генов однодольных растений. Многообещающим также представляется использование VIGS-системы на основе вируса мозаики костра безостого (brome mosaic virus, BMV), который обладает высоким инфекционным потенциалом в отношении многих видов однодольных растений.

Еще одним перспективным направлением в развитии VIGS-анализа является использование системы подавления генов, основанной на вирусах-сателлитах (satellite virus-induced silencing system, SVISS), или вирусах-спутниках. Представляя собой короткие (от ~200 до ~2000 нуклеотидов) последовательности оцРНК положительной полярности, вирусы-сателлиты являются субвирусными агентами, неспособными к автономной репликации и полностью зависимыми от вируса-хозяина. Сателлитная РНК характеризуется выраженной вторичной структурой, что обуславливает ее повышенную устойчивость к деградации рибонуклеазами, однако сама по себе она не является инфекционной. В большинстве случаев присутствие вируса-спутника ослабляет симптомы инфекции, вызванной вирусом-хозяином, и, как следствие, облегчает дифференциацию указанных симптомов от последствий сайленсинга целевого гена. Еще одно преимущество использования SVISS-системы заключается в малом размере генома вирусов-сателлитов, что значительно облегчает процедуру создания соответствующих генетических конструкций. Так, очень удобной оказалась векторная система на основе вируса-спутника табачной мозаики (satellite tobacco mosaic virus, STMV), которая была успешно использована для анализа функций целого ряда генов *N. tabacum*.

Вирусы – источники векторов для VIGS-анализа и примеры их использования для сайленсинга генов в органах растений

Вирус – источник вектора	Род	Примеры использования вектора для сайленсинга генов в органах растений
Вирус табачной мозаики (tobacco mosaic virus, TMV)	<i>Tobamovirus</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> , <i>N. benthamiana</i> (листья)
X-вирус картофеля (potato virus X, PVX)	<i>Potexvirus</i>	<i>N. benthamiana</i> (листья), <i>Solanum tuberosum</i> (листья и клубни)
Вирус погрешности табака (tobacco rattle virus, TRV)	<i>Tobravirus</i>	<i>Hyoscyamus niger</i> (листья), <i>Aquilegia vulgaris</i> (цветы), <i>Papaver somniferum</i> , <i>Eschscholzia californica</i> (листья и цветы), <i>N. benthamiana</i> , <i>N. tabacum</i> , <i>S. lycopersicum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> (различные вегетативные и генеративные органы), <i>Capsicum annuum</i> (листья и плоды), <i>Petunia hybrida</i> (листья и цветы), <i>Fragaria ananassa</i> (плоды)
Вирус штриховатой мозаики ячменя (barley stripe mosaic virus, BSMV)	<i>Hordeivirus</i>	<i>Hordeum vulgare</i> , <i>Triticum aestivum</i> , <i>Brachypodium distachyon</i> , <i>Costus spicatus</i> , <i>Zingiber officinale</i> (листья и корни)
Вирус крапчатости бобов фасоли (bean pod mottle virus, BPMV)	<i>Comovirus</i>	<i>Glycine max</i> (листья)
Вирус раннего побурения гороха (pea early browning virus, PEBV)	<i>Tobravirus</i>	<i>Pisum sativum</i> , <i>Medicago truncatula</i> , <i>Lathyrus odorata</i> (различные вегетативные и генеративные органы)
Вирус мозаики тополя (poplar mosaic virus, PopMV)	<i>Carlavirus</i>	<i>N. benthamiana</i> (листья)
Вирус мозаики коостра (brome mosaic virus, BMV)	<i>Bromovirus</i>	<i>Oryza sativa</i> , <i>Zea mays</i> , <i>H. vulgare</i> (листья)
Вирус золотистой мозаики томата (tomato golden mosaic virus, TGMV)	<i>Geminivirus</i>	<i>N. benthamiana</i> (листья)
Вирус кустистой карликовости томата (tomato bushy shunt virus, TBSV)	<i>Tombusvirus</i>	<i>N. benthamiana</i> (листья)
Вирус курчавости листьев капусты (cabbage leaf curl virus, CaLCuV)	<i>Begomovirus</i>	<i>A. thaliana</i> (листья)
Вирус мозаики маниока (african cassava mosaic virus, ACMV)	<i>Begomovirus</i>	<i>Manihot esculenta</i> (листья)
Вирус желтой курчавости листьев томата (tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)	<i>Begomovirus</i>	<i>S. lycopersicum</i> (различные вегетативные и генеративные органы), <i>N. glutinosa</i> , <i>N. tabacum</i> , <i>N. benthamiana</i> (листья)
Сферический латентный вирус яблони (apple latent spherical virus, ALSV)	<i>Cheravirus</i>	<i>N. tabacum</i> , <i>N. benthamiana</i> , <i>Cucumis sativus</i> , <i>C. melo</i> , <i>C. pepo</i> , <i>Citrullus lanatus</i> , <i>Luffa cylindrical</i> , <i>Lagenaria siceraria</i> , <i>Malus domestica</i> , <i>G. max</i> (листья)

Вирус огуречной мозаики (cucumber mosaic virus, CMV)	<i>Cucumovirus</i>	<i>G. max</i> , <i>N. benthamiana</i> , <i>Antirrhinum majus</i> (листья, цветы и семена)
Вирус мозаики <i>Cymbidium</i> (cymbidium mosaic virus, CymMV)	<i>Potexvirus</i>	<i>Phalaenopsis</i> sp. (цветы), <i>S. lycopersicum</i> (различные вегетативные и генеративные органы)
A-вирус картофеля (potato virus A, PVA)	<i>Potyvirus</i>	<i>N. benthamiana</i> (листья)
Вирус – источник вектора	Род	Примеры использования вектора для сайленсинга генов в органах растений
Вирус мозаики семян гороха (pea seed-borne mosaic virus, PSbMV)	<i>Potyvirus</i>	<i>P. sativum</i> (листья)
Вирус шарки сливы (plum pox virus, PPV)	<i>Potyvirus</i>	<i>N. benthamiana</i> (листья)
Вирус перистой крапчатости батата (sweet potato feathery mottle virus, SPFMV)	<i>Potyvirus</i>	<i>Ipomoea batatas</i> (листья)
Вирус гравировки табака (tobacco etch virus, TEV)	<i>Potyvirus</i>	<i>N. benthamiana</i> (листья)
Вирус мозаики томата (tomato mosaic virus, ToMV)	<i>Tobamovirus</i>	<i>N. benthamiana</i> (листья)
Вирус желтухи жилок перца (pepper huasteco yellow vein virus, PHYVV)	<i>Begomovirus</i>	<i>C. annuum</i> , <i>N. tabacum</i> , <i>S. lycopersicum</i> (листья)
Вирус желтой карликовости табака (tobacco yellow dwarf virus, tYdV)	<i>Geminivirus</i>	<i>Petunia hybrida</i> (листья)

3.3 Методика VIGS-анализа в растениях

Начальный этап VIGS-анализа заключается в выборе подходящей для данного случая векторной системы и создании на ее основе рекомбинантного вектора, содержащего целевую вставку. Как уже было отмечено выше, эффективность инфицирования и подавления экспрессии генов для одного и того же вектора в значительной степени зависит от вида исследуемого растения. Помимо этого, следует учитывать несколько факторов, связанных со свойствами вируса, который послужил источником для создания данного вектора. Так, у ряда вирусов (представители родов *Cucumovirus*, *Potexvirus*, *Potyvirus*), используемых в экспериментах по VIGS-анализу, были выявлены белки-супрессоры РНК-сайленсинга. Большинство вирусных белков, принадлежащих к данной группе, изначально были идентифицированы как факторы патогенности, так как их экспрессия во многом определяла образование и выраженность симптомов вирусной инфекции (деформацию и мозаику листьев, некрозы, карликовость, замедление темпов роста и пр.). В большинстве случаев экспрессия белков-супрессоров РНК-сайленсинга не является обязательным фактором для осуществления репликации генома инфекционного агента, однако вирусные супрессоры RNAi необходимы для эффективной аккумуляции вирионов в тканях растения и их дальнейшей диссеминации. В случае использования векторов, источником создания которых являлись указанные вирусы, эффективность сайленсинга целевого гена в ходе

VIGS-анализа может быть значительно снижена. Еще одним важным моментом при выборе используемого вектора является тропность вируса, послужившего основой для его создания. Например, так как вирус картофеля X (PVX) не обладает тропностью к меристематическим тканям, он непригоден для исследования функций генов, участвующих в метаболических путях, регулирующих развитие.

Следующим важным фактором для любого эксперимента, связанного с VIGS-анализом, является выбор участка гена, который будет использован для создания целевого рекомбинантного вектора. На эффективность метода VIGS в значительной степени влияет размер целевой вставки. Как правило, оптимальная эффективность достигается при протяженности вставки от ~300 до ~800 пн. В случае если размер вставки целевого гена превышает 1.5 тпн, значительно увеличивается вероятность ее потери. Нижним пределом протяженности вставки, как было определено экспериментально, является 23-25 пн. Существенным представляется факт зависимости эффективности сайленсинга коротких гомологичных последовательностей от их ориентации. Смысловая последовательность подавляется хуже, чем антисмысловая, причем точная причина данного явления неизвестна. Влияния ориентации на сайленсинг более протяженных последовательностей замечено не было.

Для сайленсинга одиночного гена, не являющегося одним из членов семейства, можно использовать практически любой участок открытой рамки считывания. В обратном случае задача существенно усложняется. Оптимальный фрагмент не должен обладать гомологией ни с одним участком других генов, принадлежащих к данному семейству, длиной более 23 пн. Хорошим выбором в данной ситуации также может являться участок нетранслируемой последовательности. В некоторых случаях, наоборот, целесообразным представляется выбор достаточно консервативного для данного семейства генов участка, что позволяет охватить сразу несколько генов семейства и наверняка подавить интересующую исследователя функцию, которая может быть продублирована несколькими генами.

Как только рекомбинантный вирусный вектор сконструирован и перенесен в *Agrobacterium tumefaciens*, возникает вопрос выбора способа инфицирования растений. На заре развития VIGS-анализа наиболее популярен был метод микропроекционной бомбардировки. В настоящее время в качестве способов инфицирования чаще всего используют вакуумную инфильтрацию, инъекции, а также внесение инокулюма в почву или искусственную среду.

3.4 Гены-репортеры

Для контроля эффективности метода VIGS широко используют гены-репортеры. Видимые изменения в фенотипе растения, опосредованные сайленсингом гена-репортера, применяют в качестве положительного контроля в экспериментах по VIGS-анализу. Очевидно, что не каждый ген может быть использован в качестве репортера, так как подавление экспрессии не всех генов сопровождается явными фенотипическими изменениями. Фенотипические изменения, обусловленные сайленсингом используемого в эксперименте гена-репортера, должны быть легко отличимы от изменений, вызванных подавлением экспрессии целевого исследуемого гена. Помимо этого, проявление сайленсинга гена-репортера должно быть удобно для визуального определения.

В целом, гены-репортеры можно разделить на две группы: эндогенные и экзогенные. Эндогенные гены, такие как ген фитоендесатуразы *PDS*, ген *ChlH*, кодирующий субъединицу Н хелатазы, ген халконсинтетазы *CHS*, участвуют в различных биохимических путях и экспрессируются в различных тканях растений. Наиболее часто в экспериментах по VIGS-анализу в качестве положительного контроля используют фенотипические изменения, обусловленные сайленсингом гена *PDS*. Продукт гена *PDS* – фитоендесатураза – катализирует реакцию дегидратации фитоена с образованием ζ-

каротина, которая представляет собой ключевой этап пути биосинтеза каротиноидов. Ингибирование экспрессии *PDS* приводит к появлению так называемых пятен выцветания на свету: листья растений с подавленной экспрессией гена становятся белыми из-за недостатка каротиноидов и разрушения хлорофилла вследствие фотоокисления. Ген *ChlH*, известный также как *Si*-ген, кодирует Н-субъединицу Mg²⁺-зависимой протопорфиринхелатазы – фермента, который катализирует конверсию протопорфирина IX до Mg²⁺-протопорфирина IX. Ингибирование экспрессии *ChlH* приводит к пожелтению листьев растений вследствие подавления синтеза хлорофилла. Хотя ингибирование экспрессии данного гена в конечном итоге также обуславливает хлороз листьев, соответствующие фенотипические изменения проявляются почти на неделю раньше, чем в случае сайленсинга гена *PDS*. Продукт гена *CHS* – халконсинтетаза – катализирует реакцию конденсации трех молекул малонил-СoА и одной молекулы 4-кумарол-СoА с образованием халкона нарингенина, который является предшественником в биосинтезе других флавоноидов и изофлавоноидов, обуславливающих окраску цветов и плодов растений. Указанная роль халконсинтетазы позволяет использовать ген *CHS* в качестве репортерного для VIGS-анализа генов, функции которых связаны с генеративными органами растений.

В последнее время в экспериментах по VIGS- анализу широкое распространение получило использование экзогенных генов-репортеров, которое, однако, требует предварительного получения соответствующих линий трансгенных растений. Наиболее часто в качестве экзогенного гена-репортера для VIGS-анализа используют *GFP Aequorea victoria*, кодирующий зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP), а также ген β-D-глюкуронидазы *GUS Escherichia coli*, ген люциферазы *LUC Photinus pyralis* и некоторые другие. Трансгенные растения с экспрессией гена *GFP* в УФ-свете обладают зеленой флуоресценцией (пик на 498 нм). Хлорофилл а характеризуется двумя полосами красной флуоресценции: главной при 666 нм и более слабой при 728 нм – поэтому нетрансформированные растения в УФ- свете выглядят красными. При сайленсинге гена *GFP* инфицированные трансгенные растения теряют зеленую флуоресценцию, что является визуальным маркером эффективности VIGS.

В одном и том же вирусном векторе исследуемый ген можно сцепить с геном-репортером. В этом случае становится возможной оценка степени сайленсинга исследуемого гена по эффективности фенотипических изменений, вызванных ингибированием экспрессии гена-репортера. При этом важно, чтобы ген-репортер не участвовал в тех биохимических путях, в которых участвует исследуемый ген. Так, например, гены *PDS* и *ChlH* нельзя использовать в качестве репортеров при исследовании функций тех генов, которые участвуют в регуляции биосинтеза хлорофилла, каротиноидов, флавоноидов и изофлавоноидов. В таких случаях предпочтительным является использование экзогенных генов-репортеров, не вовлеченных ни в какие биохимические пути внутри растения и, следовательно, не влияющих на процессы его роста и развития.

3.5 Исследование функций генов растений с использованием метода VIGS

В настоящее время стратегия VIGS-анализа как одного из наиболее удобных методов “обратной” генетики находит все более широкое применение в исследовании функций генов растений.

Наиболее часто метод VIGS используют для разделения сигнальных компонентов, связанных с устойчивостью растений к биотическим стрессам различной этиологии. Так, с использованием векторной системы на основе вируса крапчатости бобов фасоли (BPMV) был проведен функциональный анализ генов, связанных с устойчивостью к нематодам, а с использованием векторной системы на основе вируса погремковости табака (TRV) был проведен функциональный анализ генов *Gossypium hirsutum* и *S. lycopersicum*, связанных

соответственно с устойчивостью к фитопатогенным аскомицетам *Verticillium dahliae* и *Botrytis cinerea*.

Метод VIGS также нашел обширное применение в исследовании функций генов, задействованных в регуляции процессов метаболизма, роста и развития растений. Так, система на основе вируса TRV была использована для анализа генов, связанных с процессом созревания плодов *Fragaria ananassa* и *S. lycopersicum*.

Недавно метод VIGS был использован для эффективного подавления генов при проведении исследований в масштабе полного генома растения. В частности, VIGS-анализ с применением векторов на основе вируса погремковости табака, разработанных с помощью стратегии рекомбинационного клонирования Gateway (“Invitrogen”, США), был успешно использован для эффективного анализа геномов многих двудольных растений. Векторная система на основе вируса штриховатой мозаики ячменя была использована для VIGS-опосредованного скрининга геномов ряда однодольных растений.

С развитием и совершенствованием векторов и методов инфицирования растений и различных векторных систем метод VIGS-анализа все чаще используют для исследования молекулярно-генетических и физиолого-биохимических механизмов регуляции функциональных систем растений. Благодаря применению различных комбинаций генетических и молекулярно-биологических методов достигнут значительный прогресс в понимании механизма VIGS. В дальнейшем, несомненно, VIGS-анализ, в числе прочих экспериментальных методов, будет играть существенную роль в исследовании функций генов растений.

4. Вироид веретеновидности клубней картофеля - как пример генетических механизмов, лежащих в основе вирулентности и патогенеза

Вироиды – высококомплементарные кольцевые одноцепочечные РНК, автономно реплицирующиеся в зараженном растении и вызывающие симптомы от легких до летальных. Геном вириода состоит из кольцевой РНК длиной 250-400 нуклеотидов, в зависимости от вида вириода. Так, для вириодов Avocado sunblotch (ASBVd) и Coconut-cadang размер генома составляет 246 нуклеотидов, а для вириода Chrysanthemum chlorotic mottle (CschMVd) – 401 нуклеотид. Вироиды имеют наименьший размер геномной РНК и при этом не кодируют белковых продуктов. Механизмы репликации вириодов и их взаимодействие с растением-хозяином привлекают внимание не только фитопатологов, но и специалистов в области молекулярной биологии и молекулярной эволюции.

Один из наиболее изученных вириодов – это вироид веретеновидности клубней картофеля (ВВКК; англ. Potato spindle tuber viroid, PSTVd). Он представляет значительную угрозу для этой сельскохозяйственной культуры, поскольку вегетативное размножение сортового картофеля обуславливает его слабую вирусостойчивость. При заражении ВВКК неустойчивых сортов картофеля, особенно в сочетании с другой вирусной инфекцией, их продуктивность может снижаться на 40-70%. Для заболевания характерны появление деформированных листьев (морщинистость, скручивание), отставание в росте, вплоть до карликовости, появление клубней веретеновидной формы с выпуклыми глазками и трещинами. В статье представлен обзор литературных данных за последние пять лет о молекулярной генетике ВВКК и механизмах формирования патологических состояний у растений-реципиентов.

4.1 Структура генома ВВКК, популяции молекул и квазивиды

Описаны штаммы ВВКК, вызывающие различные по степени тяжести симптомы у пораженных растений. Например, вариант PSTVd-Dahlia у томата вызывает слабовыраженные симптомы заболевания, а штамм PSTVd-Intermediate – сильное поражение. Эти два штамма различаются мутациями в девяти позициях, шесть из которых расположены в определенных элементах структуры геномной РНК (left terminal domain, pathogenicity domain). Структурно-функциональный анализ показал, что мутация в позиции 42 снижает проявление симптомов и накопление вириона, мутация в позиции 64 уменьшает ингибирование роста. В целом мутационные эксперименты позволили определить позиции, значимо влияющие на репликацию геномной РНК и проявление симптомов поражения у растений-хозяев. В настоящее время имеются данные о воздействии тех или иных мутаций на структуру РНК вириона и ее функциональные особенности, что в перспективе позволит выявить регуляторные сайты и их мишени в клетках растений-хозяев. Так, в работе показана связь между петлей 27 (позиции 177-182 в геномной РНК), сходной со структурным элементом в 3'-НТП мРНК гистонов животных, и способностью реплицироваться в клетках растений и транспортироваться между разными типами клеток. Вирионы являются перспективной моделью для исследования физико-химической организации регуляторных и каталитических РНК и малоизученного мира РНК-зависимой регуляции клеточных процессов. В частности, во вторичной структуре ВВКК расположены 17 пар G/U, многие из которых консервативны и важны для репликации и системного распространения по растению. Интересно, что механизмы процессинга РНК вириона достаточно эволюционно консервативны; например, искусственные конструкции на основе ВВКК способны формировать кольцевые формы РНК в *Saccharomyces cerevisiae*.

При репликации геномной РНК вирионов часто происходят ошибки, приводящие к появлению популяции молекул РНК с различной структурой (квазивиды). В работе были определены 10 наиболее часто встречающихся вариантов нуклеотидной последовательности геномной РНК ВВКК в различных временных точках после инокуляции растений томата. Важно отметить, что через 7 дней после инокуляции только 25% молекул геномной РНК ВВКК соответствовали исходной матрице, однако эта доля увеличилась до 70% через 14 дней и оставалась на том же уровне спустя 28 дней. По-видимому, в ходе репликации возникает большое разнообразие структурных вариантов, некоторые из которых способны вносить вклад как в развитие симптомов поражения, так и в ингибирование экспрессии генов растения-хозяина, контролирующей защитный ответ. Сравнительный анализ уровня накопления мутаций в геномной РНК показал, что у вирионов, реплицирующихся в пластидах, он значительно выше (1/800-1/1000 нуклеотидов), чем у вирионов, реплицирующихся в ядре (например, для ВВКК – 1/3800-1/7000).

Исследования по оценке устойчивости РНК вириона к мутациям важны для понимания молекулярных механизмов его репликации и контроля жизненного цикла. В работе при внесении 3-4 нуклеотидных делеций или инсерций в три позиции в составе геномной РНК ВВКК в двух случаях нарушалась способность к репликации, тогда как в одном случае она сохранялась, но молекула теряла стабильность. Анализ популяции молекул РНК этого варианта вириона в растениях томата показал не только реверсию к исходной форме, но и появление десяти новых генетически стабильных форм, отличающихся от исходной мастер-копии. По-видимому, при сохранении способности к репликации вирион обладает высоким потенциалом к отбору эффективных инфекционных форм.

Вирионы способны передаваться как вертикально (через генеративные клетки зараженного растения), так и горизонтально (с пылью зараженного растения). ВВКК может передаваться вертикально при формировании макроспор, некоторые другие вирионы, такие как вирион болезни «планта махо» у томатов (tomato planta macho viroid, TPMVd),

передаются с пылью, вызывая системную инфекцию растения-реципиента. Исследование структуры геномной РНК этого вириода показало, что домены *terminal left* (TL) и *pathogenicity* (P) отвечают в частности за горизонтальный перенос. Характерно, что вириод переносился в растения томата с пылью инфицированных растений петунии, т. е. оплодотворение для горизонтального переноса патогена не является необходимым.

4.2 Механизмы патогенеза, иммунный ответ и РНК-интерференция

Исследование растений картофеля на разных стадиях после инокуляции ВВКК показало, что содержание жасмоновой кислоты значительно увеличено в листьях, кастастерона – в листьях и корнях. Количество индол-3-уксусной кислоты увеличено только в клубнях, различий в содержании салициловой и абсцизовой кислот не зафиксировано. В дополнение вириод индуцировал продукцию активных форм кислорода, что сопровождалось увеличением активности антиоксидантов. При анализе метаболома растений томата в ответ на инфицирование ВВКК были обнаружены существенные изменения в содержании 79 метаболитов, относящихся к 23 метаболическим путям, в том числе путям синтеза защитных веществ.

Молекулярные механизмы, определяющие степень тяжести симптомов поражения растений разными штаммами ВВКК, остаются малоизученными. Известно, что выраженность симптомов зависит также от генотипа растений и условий окружающей среды. Сравнительный анализ транскриптома листьев томата при инокуляции сильно- и слабопатогенными штаммами ВВКК выявил в совокупности наличие более 3000 дифференциально-экспрессирующихся генов, большая часть которых была выявлена только при инокуляции сильнопатогенным штаммом. В обоих случаях у растений активировался системный иммунный ответ, но при инфекции сильнопатогенным штаммом степень выраженности была существенно выше. Аналогичным образом, проявление симптомов в последнем случае может быть связано с изменениями в экспрессии генов транскрипционного фактора *C2C2-GATA* и фактора-регулятора роста (*GRF*). Сходные результаты были получены при сравнительном анализе транскриптомов корней томата, инокулированных сильно- и слабопатогенными штаммами вириода ВВКК: помимо индукции иммунного ответа, значительные изменения наблюдались в экспрессии генов, контролирующих синтез лигнина, формирование клеточной стенки, участников сигнальных путей ауксина и цитокинина. В целом механизмы индукции иммунного ответа у растений на вириод требуют дополнительного исследования, так как отсутствуют чужеродные молекулярные паттерны (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP).

Сама по себе репликация вириода не обязательно приводит к выраженным фенотипическим проявлениям, и разные штаммы ВВКК могут сильно различаться по этому параметру. Вероятно, изменения фенотипа растений при репликации вириода могут быть связаны с индукцией РНК-интерференции и супрессией генов растения-хозяина, в структуре мРНК которых есть сегменты гомологии с РНК вириода. То есть собственно симптомы заболевания при инфицировании вириодом могут быть связаны с супрессией отдельных генов растения, участвующих в контроле морфогенеза, физиологических и биохимических функций. Ниже перечислены несколько работ, в которых приведены данные в пользу этой гипотезы.

У картофеля ВВКК вызывает угнетение роста, морфологические aberrации листьев и клубней, потери урожая. ВВКК-индуцированные малые РНК связаны с супрессией гена *StTCP23*, принадлежащего к семейству транскрипционных факторов TCP (*teosinte branched1/Cycloidea/Proliferating cell factor*). мРНК *StTCP23* содержит в составе 3'-НТП сегмент размером 21 нуклеотид, комплементарный региону VMR (*virulence-modulating region*) в геномной РНК штамма ВВКК RG1. При экспериментальном моделировании супрессии гена *StTCP23* с помощью искусственных микроРНК в трансгенных растениях

(как и при применении других технологий экспериментальной РНК-интерференции) появлялся фенотип, близкий к симптомам поражения виroidом, причем степень выраженности симптомов была пропорциональна уровню снижения транскрипционной активности гена-мишени. Функции гена *StTCP23* связаны с регуляторным контуром гиббереллиновой кислоты, что имеет непосредственное отношение к росту растений и морфогенезу клубня.

Система РНК-интерференции в клетках растений генерирует vd-sRNAs (viroid-derived small RNAs), которые способны связываться с белками группы Argonaute и инактивировать мРНК-мишени. Репликация ВВКК происходит в ядре, в этом случае vd-sRNAs появляются на поздних стадиях развития инфекции в рамках системного ответа в разных частях растения, в случае peach latent mosaic viroid (PLMVd), который реплицируется в пластидах, vd-sRNAs появляются на раннем этапе и локально в месте инокуляции.

Одна из vd-sRNAs ВВКК способна ингибировать экспрессию гена, кодирующего FRIGIDA-like protein 3 у томата, так как в этой мРНК есть гомологичный участок. К числу симптомов при инфицировании томата сильнопатогенными штаммами ВВКК относится индукция раннего цветения. Экспериментальное снижение экспрессии гена-мишени vd-sRNAs ВВКК подтвердило эту взаимосвязь. По-видимому, участки гомологии в составе РНК вироида или промежуточных репликативных форм способны ингибировать экспрессию и других генов растений-хозяев.

Как и в случае РНК-содержащих вирусов, РНК-интерференция является способом контроля вироида. Супрессия генов, кодирующих белки Dicer 2 и Dicer 4 у растений томата, приводит к увеличению накопления РНК вироида и усиливает степень поражения. Интересно, что отсутствие этих белков снижает способность растений контролировать синтез активных форм кислорода, что сказывается также на иммунном ответе.

В структуре мРНК эукариот помимо белок-кодирующей части (открытой рамки считывания, CDS) выделяют 5'- и 3'-концевые нетранслируемые последовательности (НТП). 5'-НТП играет важную роль в контроле процесса инициации трансляции, в то время как функции 3'-НТП могут быть связаны с контролем цитоплазматической стабильности индивидуальных мРНК. В качестве адресной нуклеотидной последовательности для РНК-интерференции при конструировании двуцепочечных РНК можно использовать более протяженные 3'-НТП мРНК гена-мишени. В отличие от белок-кодирующих участков они в большинстве случаев не являются эволюционно-консервативными, что расширяет диапазон имеющихся возможностей для селективного видоспецифического «выключения» отдельных генов. Этот подход может использоваться как для предотвращения развития симптомов заболевания (при удалении сегмента гомологии между РНК ВВКК и 3'-НТП мРНК гена-мишени с помощью геномного редактирования), так и для индукции РНК-интерференции против РНК ВВКК.

4.3 Биоинформатические методы идентификации и анализа виридов

Появление технологий массового секвенирования дало мощный толчок новым методам исследования виридов, поскольку появилась возможность проводить массовый анализ их нуклеотидных последовательностей. Следует отметить, что биоинформатические методы идентификации и анализа виридов на основе высокопроизводительного секвенирования во многом опираются на подходы, которые были разработаны ранее для анализа вирусных метагеномов. При этом необходимо принимать во внимание, что между различными группами вирусов растений существуют значительные различия в организации генетического материала, так же как и между вирусами и виридами. Например, группа В, к которой принадлежит ВВКК, отличается от другой группы виридов, А, по первичной и

вторичной структуре и механизму репликации. Однако между вирусами и виридами существуют и общие черты.

В частности, изучение вирусных сообществ осложнено тем, что вирусные популяции в тканях зараженного организма неоднородны, что в основном связано с низкой точностью репликации. Это неизбежно приводит к высокому уровню мутаций и, как следствие, к высокой вариабельности даже в пределах одной и той же популяции, состоящей из так называемых квазивидов вируса. Аналогичные особенности характерны и для виридов. Поэтому с точки зрения биоинформатического анализа идентификация и реконструкция последовательностей вирусов и виридов в значительной степени зависят от подходов к предсказанию структуры последовательностей *de novo*, а не только базируются на сопоставлении с референсной нуклеотидной последовательностью из банка данных. Учитывая, что отделить вирусные матрицы от клеточных затруднительно, при секвенировании требуется высокий уровень покрытия. В качестве альтернативы рассматривается возможность обогащения выделенного транскриптома вирусными РНК. Иными словами, проекты, нацеленные на характеристику вирусных/виридных метагеномов у растений, могут стать очень дорогостоящими, поскольку они основаны на секвенировании полных ДНК или РНК-библиотек, в которых вирусный материал может составлять небольшую часть.

Для обнаружения и анализа виридных последовательностей применяют следующие направления их исследований:

- 1) Анализ транскриптомов растений, в составе которых содержатся РНК вирусов и виридов.
- 2) Анализ полиморфизмов нуклеотидной последовательности в популяции молекул вирида в транскриптоме одного организма.
- 3) Анализ полиморфизмов в структуре геномной РНК вирида в популяциях растений.

Для решения проблемы увеличения доли РНК вирусов в транскриптомных библиотеках предложены подходы, основанные на деплеции (обеднении) последовательностей полного транскриптома за счет некоторых его фракций, которые не содержат РНК вирусов/виридов. К таким фракциям относят, как правило, малые РНК или рибосомальные РНК растений. В работе исследовалась возможность использования методов высокопроизводительного секвенирования для идентификации широкого спектра вирусных и виридных последовательностей у растений. Сравнивались два подхода к подготовке библиотек РНК растений: обедненных по содержанию малых РНК или по содержанию рибосомальных РНК. Анализировались девять образцов транскриптомов инфицированных вирусами растений (включая томат, табак, горох и др.). Авторы показали, что доля прочтений вирусной/виридной фракции среди секвенированных последовательностей существенно зависит от вида растения-хозяина и от самого вируса. В одних случаях более продуктивным оказалось обеднение по содержанию малых РНК, в других – по рибосомным РНК. В случае идентификации вирусных последовательностей методом картирования, для хорошей идентификации полных геномов вирусов было достаточно прочтений объемом в 10 млн нуклеотидов. При этом деплеция по малым РНК продуктивна для идентификации вирусов с геномом из одноцепочечной ДНК и виридов, тогда как деплеция по содержанию рРНК более эффективна при идентификации вирусов с РНК-геномами, за исключением вируса *Y* картофеля. Считается, что стратегия сборки транскриптома *de novo* предпочтительна для обнаружения новых вирусов по сравнению с выравниванием прочтений на известные вирусные последовательности.

Для идентификации виридов на основе анализа секвенированных фрагментов транскриптома Varro с коллегами предложили вычислительный конвейер VSD (Viral Surveillance and Diagnosis). Этот пакет программ направлен на идентификацию последовательностей вирусов и виридов в транскриптомах растений, полученных с помощью секвенирования короткими прочтениями (21-24 нуклеотида). Он включает

несколько функциональных блоков (см. рисунок). Первый блок направлен на сборку последовательностей транскриптома из коротких прочтений. На этом этапе прочтения подвергаются удалению адаптеров и отфильтровываются по качеству прочтения. Затем происходит сборка последовательностей *de novo* из коротких фрагментов с помощью программы SPAdes. После этого полученные контиги дополнительно кластеризуют и сливают с помощью программы CAP3. На этом этап сборки заканчивается. Для дальнейшего анализа отбирают контиги длиной более 40 нуклеотидов.

Следующим этапом анализа является идентификация в собранном пуле транскриптов нуклеотидных последовательностей, соответствующих геномам растений, вирусов и вириодов. Эту процедуру осуществляют с помощью программы BLASTN с применением специально подготовленных баз данных нуклеотидных последовательностей (включают последовательности РНК и ДНК растений, вирусов и вириодов). Дополнительно с помощью программы BLASTX производят поиск последовательностей, предположительно кодирующих белки растений и вирусов.

На третьем этапе анализа производится поиск новых вириодных последовательностей, отсутствующих в базах данных. Для этого последовательности длиной 200-460 п.н., которые не обнаружили сходства с уже известными последовательностями, проверяют на существование кольцевых форм, при наличии которых наблюдается перекрывание их 5'- и 3'-концевых фрагментов. Те из них, которые обнаруживают такое перекрывание, считаются кандидатами на новые вириодные последовательности.

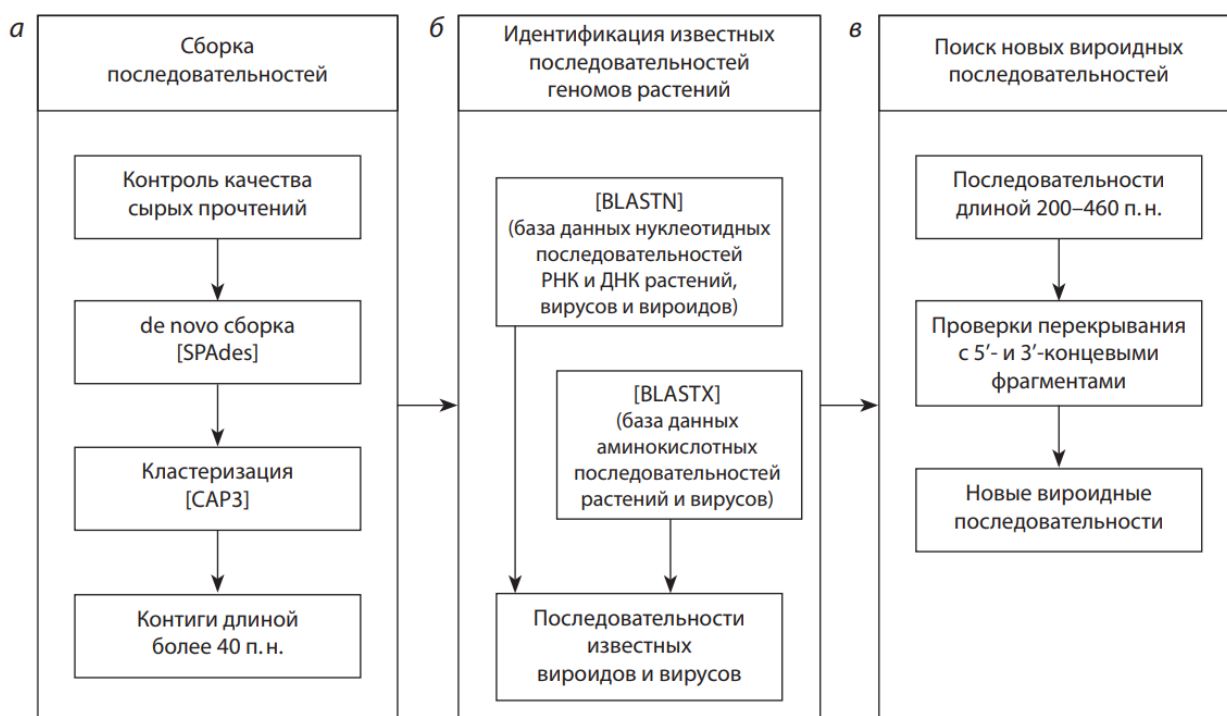


Схема вычислительного конвейера VSD для идентификации вирусных и вириодных последовательностей в транскриптомах растений.

Конвейер делится на три этапа: а – сборка последовательностей *de novo*; б – идентификация известных последовательностей вириодов и вирусов растений; в – поиск новых вириодных последовательностей.

Метод идентификации последовательностей вириодов в транскриптомах растений с помощью картирования коротких прочтений на референсные последовательности вириодов предложен Brass с коллегами. Для этого использовался стандартный протокол

биоинформатического анализа: удаление адаптерных последовательностей и поли-А трактов программами PrinSeq и TRIMMOMATIC, фильтрация прочтений по качеству, выравнивание прочтений на геном вириода программой SEGEMENL. С помощью подобного подхода были выявлены полиморфизмы в последовательностях вириодов. Авторы разработали также метод реконструкции полиморфных вариантов последовательностей вириодов на основе метода анализа графов. Это позволило идентифицировать уникальные последовательности квазивидов в пуле вириодных последовательностей, алгоритм был применен для анализа трех наборов данных по транскриптомам томата: транскриптом сорта 'Heinz 1706', подверженный заражению ВВКК (варианты QFA, C3, AS1); транскриптом сорта Rutgers, также пораженный ВВКК (варианты M, I); транскриптомы четырех сортов, инфицированных ВВКК (вариант RG). Полученные данные позволили оценить динамику эволюции вириодов с помощью модели Эйгена для квазивидов.

Вопросы:

- 1) Привести пример сложного патогена как задачи агрогенетики для создания устойчивых форм картофеля.
- 2) Описать генетические особенности ответа растений на паразитические РНК, ее особенности, затрудняющие создание устойчивых форм, а также разрабатываемые подходы для решения этой актуальной проблемы

5. Нематоды - примеры генетических механизмов, лежащих в основе устойчивости растений и развития новых высокопатогенных изолятов нематод

Фитопаразитические нематоды относятся к числу значимых вредителей сельского хозяйства и распространены по всему миру (около 4 тыс. видов, большинство из которых встречаются в странах с тропическим и субтропическим климатом). Из многочисленных видов фитопаразитических нематод в обзоре наибольшее внимание уделено цистообразующим и галловым, поскольку к ним относятся виды, наносящие значительный урон экономически важным сельскохозяйственным культурам растений, среди которых *Globodera rostochiensis*, *G. pallida*, *Heterodera schachtii*, *Meloidogyne chitwoodi*, *Meloidogyne incognita*. Следует отметить, что *M. incognita* называют наиболее опасным и вредным организмом, поражающим культурные растения.

Разработка способов борьбы с паразитическими нематодами считается одной из актуальных биотехнологических задач, однако их биологические особенности затрудняют применение типовых агротехнических и химических методов защиты. Примером может служить золотистая картофельная нематода (ЗКН) *G. rostochiensis* – широко распространенный карантинный вредитель, приводящий к существенным потерям в картофелеводстве. В России ЗКН зарегистрирована в 61 субъекте, включающем 861 административный район на территории общей площадью 1.8 млн га. В зависимости от сорта и сезонных условий потери урожая картофеля могут составлять от 19 до 90%, при этом покоящиеся в почве цисты ЗКН способны сохранять жизнеспособность более 30 лет. Кроме того, следует учитывать высокую вероятность распространения ЗКН в новых, не характерных для этого вида регионах вследствие прогнозов по изменению климата, а также возможности появления на территории РФ других опасных для картофелеводства карантинных видов нематод.

Способы борьбы с ЗКН включают использование нематодцидов и применение в севообороте родственных культур, способных инициировать выход личинок ЗКН, но не являющихся для них хозяевами, что приводит к гибели личинок и снижению инфицированности почвы (например, *Solanum sisymbriifolium*). Однако эти методы могут быть недостаточно результативны или экологичны: так, эффективные нематодциды токсичны и запрещены в европейских странах. Таким образом, предпочтительным подходом к контролю ЗКН в разных странах является возделывание устойчивых сортов с интрогрессированными генами устойчивости (*R*-генами) от родственных культурных (*S. tuberosum* ssp. *andigenum*) и дикорастущих (*S. canasense*, *S. oplocense*, *S. spegazzinii*, *S. vernei*) видов картофеля.

Молекулярные механизмы патогенеза также превращают ЗКН в непростую мишень для существующих способов защиты растений. Личинки ЗКН после выхода из яиц в почве проникают в корни восприимчивых растений, движутся до проводящих тканей и инициируют формирование питающего синцития. Для этого личинка ЗКН впрыскивает в клетки растения секрет из пищеводных желез, инициирующий репрограммирование и слияние клеток в синцитий (описаны синцитии, образовавшиеся в результате последовательного слияния более чем 200 клеток), а также ингибирующий иммунный ответ у восприимчивых сортов. Сходный механизм формирования системы питания выработали галлообразующие нематоды семейства *Meloidogynidae* (мелойдогинид), также способные репрограммировать клетки растения-хозяина, инициировать процесс митоза без цитокинеза с формированием так называемых гигантских клеток, размер которых может более чем в 300 раз превышать исходную клетку. Личинка нематоды в данном случае формирует специализированный орган – галл, в котором может быть несколько гигантских клеток. Оба типа питающих структур (синцитий и гигантские клетки) характеризуются общими структурно-функциональными особенностями: развитый эндоплазматический ретикулум, утолщенные клеточные стенки, большое количество митохондрий, фрагментированная вакуоль и т. п. Механизмы индуцированного нематодами репрограммирования активно исследуют, так как этот биологический феномен представляет собой перспективную модель для изучения генетического контроля морфогенеза растений.

Известно, что личинки южной галловой нематоды *Meloidogyne incognita* секретируют сложный набор веществ различной природы, содержащий не менее 500 белков, функции большинства из которых неизвестны. В настоящее время можно выделить несколько PPN-эффекторов (plant parasitic nematode effectors), о функциях которых есть экспериментальные данные.

5.1 PPN-эффекторы, способные связывать активные формы кислорода (АФК), которые образуются в результате сверхчувствительной реакции

Эффективные способы борьбы с патогенами, выработанные растениями в ходе эволюции, включают распознавание специфических молекулярных паттернов (pathogen-associated molecular patterns, PAMP), индукцию системного защитного ответа и локально – программируемой клеточной смерти в месте инвазии. В случае личинок нематод зона мертвых клеток блокирует поступление питательных веществ и останавливает жизненный цикл. Известно, что АФК являются одним из ключевых медиаторов в регуляторных контурах, контролирующими этот вид иммунного ответа (effector-triggered immunity, ETI). Показано, что один из PPN-эффекторов яванской галловой нематоды *Meloidogyne javanica* взаимодействует с каталитической субъединицей тиоредоксинредуктазы и связывает АФК, что блокирует передачу сигнала и ингибирует развитие иммунного ответа. Другую клеточную систему используют для этой же цели личинки свекловичной цистообразующей нематоды *Heterodera schachtii*: эффектор Hs10A06 связывается со спермидинсинтазой, что увеличивает синтез спермидина, также связывающего АФК.

5.2 PPN-эффекторы, ингибирующие локальный и системный иммунный ответ

Помимо связывания АФК PPN-эффекторы способны инактивировать PR-белки и ингибировать системный иммунный ответ, в частности в качестве мишеней могут быть использованы ферменты бета-1,3-эндоглюканазы, 1,3-бета-глюкансинтазы и др. Для ингибирования специфического иммунитета можно применять инактивацию специфического белка-рецептора: например, PPN-эффектор *G. pallida* RHA1B является убиквитинлигазой, способной как активировать убиквитинилирование и протеолиз белка-рецептора семейства NBS-LRR, так и ингибировать индукцию специфического иммунитета в целом, например в ответ на молекулярные паттерны других патогенов.

5.3 PPN-эффекторы, способные ингибировать иммунный ответ на уровне молекулярно-генетических регуляторных контуров

В качестве примера можно привести эффектор *M. incognita*, взаимодействующий с одной из субъединиц сигнасомы COP9. Характерно, что этот белок, участвующий в пути передачи сигнала салициловой кислоты, также является мишенью для ряда эффекторов грибов и вирусов. Аналогичным образом PPN-эффекторы сразу нескольких видов нематод (*M. chitwoodi*, *G. rostochiensis*, *H. schachtii*) используют в качестве мишени белок PLCP (papain-like cysteine protein), который также служит одной из общих мишеней для различных патогенов.

5.4 PPN-эффекторы, задействованные в индукции формирования синцития или гигантских клеток

Про функции этих белков известно немного. Цистообразующая бледная картофельная нематода *G. pallida* продуцирует эффектор GpSPRY-414-2, который связывается с белком CLASP, ассоциированным с микротрубочками и участвующим в делении и росте клеток; вероятно, эту мишень используют для реорганизации цитоскелета в синцитии. Можно отметить PPN-эффекторы цистообразующих нематод, структура которых сходна с CLAVATA3 (CLV3)/ESR (CLE) – регуляторными пептидами, задействованными в контроле деления и дифференцировки клеток растений, а также эффекторы *H. schachtii*, взаимодействующие с транспортером ауксина LAX3. Тема репрограммирования клеток растения-хозяина тесно связана и с вопросом специфичности нематод: помимо преодоления иммунной системы важным элементом жизненного цикла патогена является адресное воздействие на системы молекулярно-генетического управления морфогенезом, что также относится к актуальным направлениям исследований.

5.5 Гены устойчивости (R-гены)

Гены устойчивости к *G. rostochiensis* свидетельствуют о том, что в настоящее время большинство сортов картофеля содержат по одному R-гену, обеспечивающему высокую устойчивость к патотипу ЗКН Ro1. К их числу относятся *H1*, интрогрессированный от *S. tuberosum* ssp. *andigenum*, и *Gro1-4* от *S. spengazzinii*. Защита, контролируемая идентифицированными генами устойчивости, основана на механизме реакции сверхчувствительности: индукция программируемой клеточной смерти формирует зону мертвых клеток, отсекающих личинку ЗКН от поступления питательных веществ, что не позволяет ей завершить жизненный цикл. Несмотря на то, что гены *H1* и *Gro1-4* сохраняют эффективность в Европе и России, следует учитывать, что нематоды способны к быстрой эволюции, поэтому поиск новых генов устойчивости к ЗКН считается одной из

приоритетных задач генетики растений. Одним из классических способов расширения набора генов устойчивости с перспективами их дальнейшего пирамидирования является поиск новых генов в природных популяциях растений. В качестве примера можно привести систематический скрининг биоресурсных коллекций ВИР, показавший наличие нового *R*-гена для *G. rostochiensis* у некоторых генотипов *S. phureja*. Сравнительный анализ транскриптомов устойчивых и восприимчивых генотипов позволил определить механизм устойчивости, основанный на индукции реакции сверхчувствительности и локальной программируемой клеточной смерти в зоне инвазии личинок. Особенности взаимодействия нематод с корнями растений служат существенное повреждение тканей при миграции личинок и индукция неспецифического ответа на этот вид стресса (wounding), который у устойчивых линий дополняется специфическим PAMP-опосредованным иммунным ответом в виде реакции сверхчувствительности и системного синтеза защитных белков.

Подобный подход использован для изучения генетических механизмов устойчивости к галловым нематодам различных экономически важных видов пасленовых, например картофеля, томата и табака. В работе S. Bali и коллег исследован селекционный клон с интрогрессированным из дикого диплоидного мексиканского вида картофеля *S. bulbocastanum* геном *RMCI(bulb)*, обеспечивающим устойчивость к *Meloidogyne chitwoodi*. Личинки нематоды проникают в корни как восприимчивых, так и устойчивых сортов растений, однако PAMP-опосредованная реакция сверхчувствительности ограничивает формирование питающих гигантских клеток, и жизненный цикл нематоды прерывается. Развитие иммунного ответа приводит к масштабным изменениям в транскриптоме, что позволяет выявлять дифференциально экспрессирующиеся гены у восприимчивых и устойчивых генотипов, реконструировать системы взаимодействующих генов (генные сети), пути передачи сигнала и молекулярные механизмы устойчивости. Показано, что индукция устойчивости связана с накоплением АФК, увеличением активности генов сигнальных путей жасмоновой и салициловой кислот, синтеза компонентов клеточной стенки, полиаминов, PR-белков. Исследовано взаимодействие устойчивых и восприимчивых генотипов *Nicotiana tabacum* с *M. incognita*. На этой модели также продемонстрировано, что личинки нематод проникают в корни как устойчивых, так и восприимчивых растений, но у первых на седьмой день инициируются реакция сверхчувствительности и локальный некроз в районе гигантских питающих клеток. В результате сравнительного анализа транскриптома и дифференциально экспрессирующихся генов выявлены путь передачи сигнала салициловой кислоты, гены антиоксидантов, а также метаболические пути синтеза фенилпропаноидов, алкалоидов и терпеноидов, что может быть характерно для табака.

Несмотря на то, что защитные механизмы часто связаны со специфическими рецепторами и индукцией реакции сверхчувствительности, в основе иммунного ответа могут быть разные молекулярные события. Можно отметить, что разнообразие защитных механизмов в природных популяциях растений изучено недостаточно и новые варианты генов устойчивости могут отличаться от классических рецепторов семейства NBS-LRR, активирующих реакцию сверхчувствительности при появлении нематод-специфических молекулярных паттернов. Например, ген *Rhgl* сои, кодирующий специфический вариант белка везикулярного транспорта α -SNAP, способен интерферировать с молекулярными механизмами патогенеза цистообразующих нематод, однако при этом его экспрессия в трансгенных растениях других видов (картофеля, арабидопсиса, других разновидностей сои) приводила как к увеличенной устойчивости к *H. schachtii*, *G. rostochiensis* и *G. pallida*, так и негативно влияла на рост и развитие растений. По-видимому, в процессе эволюции у устойчивых форм сои сформировался баланс в экспрессии генов, кодирующих белки α -SNAP, обеспечивающий устойчивость к патогену и компенсацию негативного эффекта такого необычного *R*-гена.

5.6 Новые способы генетического контроля устойчивости растений к нематодам

В последнее время значительный интерес вызывает один из вариантов технологии РНК-интерференции, а именно HIGS (host induced gene silencing), представляющий собой адресное выключение экспрессии гена-мишени в клетках личинки нематоды с помощью специфических двуцепочечных РНК (дцРНК), синтезирующихся в клетках растения-хозяина. дцРНК способны индуцировать систему защитного ответа на основе РНК-интерференции, приводящую к появлению коротких интерферирующих РНК (short interfering RNA, siRNA) и комплексов RISC, способных распознавать и разрушать мишени – молекулы РНК, содержащие участки, идентичные или высокоомологичные такой дцРНК-затравке. Этот механизм является не только способом борьбы с вирусами, но и одним из фундаментальных молекулярных механизмов контроля экспрессии генов у эукариот. Однако дцРНК, siRNA или другие промежуточные формы процесса РНК-интерференции могут проникать в клетки организмов, взаимодействующих с растением, например в клетки пищеварительной системы насекомых-фитофагов, гифы паразитических грибов, клетки нематод и др. При этом если дцРНК сконструирована из сегментов мРНК, соответствующих не гену растения-хозяина, а гену фитофага, то в ряде случаев при взаимодействии этого фитофага с растением отмечены индукция РНК-интерференции и специфическое ингибирование экспрессии гена-мишени в клетках фитофага. Если данный ген выполнял жизненно важные функции, то растения, продуцирующие такие дцРНК, становились токсичными для соответствующего вредителя.

Указанный биологический феномен демонстрирует возможность обмена регуляторной генетической информацией между организмами различной таксономической принадлежности в природных и искусственных экосистемах, что требует дальнейшего всестороннего исследования. Тем не менее очевидно и прикладное значение феномена HIGS, так как дцРНК, специфические для мРНК конкретного гена-мишени, не оказывают воздействия на организмы, в транскриптомах которых нет мРНК с протяженными участками сходства. В структуре мРНК эукариот помимо белок-кодирующей части (открытой рамки считывания, CDS) выделяют 5'- и 3'-концевые не-транслируемые последовательности (НТП). 5'-НТП играет важную роль в контроле инициации трансляции, в то время как функции 3'-НТП могут быть связаны с управлением цитоплазматической стабильности индивидуальных мРНК. В качестве адресной нуклеотидной последовательности для индукции РНК-интерференции при конструировании дцРНК можно использовать более протяженные 3'-НТП мРНК гена-мишени, которые, в отличие от белок-кодирующих участков, в большинстве случаев не являются эволюционно консервативными, что расширяет диапазон возможностей селективного видоспецифического выключения отдельных генов.

Следует отметить, что эффективность воздействия дцРНК может зависеть от морфологических и биохимических особенностей организма-мишени, в частности включающих барьеры на пути проникновения дцРНК внутрь клеток и содержание в тканях дцРНК-специфических рибонуклеаз. При этом не все гены организма-реципиента могут быть супрессированы с помощью РНК-интерференции. Результаты систематического исследования генов домашнего хозяйства *M. incognita* в перспективе могут быть использованы как мишени для HIGS. Выбор подходящего гена-мишени – одна из важных задач, так как некоторые гены домашнего хозяйства могут быть малочувствительны к РНК-интерференции либо эффект от их супрессии может быть недостаточно выражен. Авторы использовали методику, адаптированную из ранних экспериментов на *Caenorhabditis elegans*, – вымачивание личинок нематоды в растворе, содержащем дцРНК, и последующий анализ характеристик, включая инфекционную способность личинок и характеристики взрослых нематод после инфицирования личинками растений томата. Проанализировано 20 генов: экспрессия восьми генов не репрессировалась дцРНК и не вызывала морфологических проявлений, в то время как супрессия десяти генов приводила к

абберациям в морфологических характеристиках нематод и снижению их способности к инфицированию растений. Трансгенные растения, экспрессирующие дцРНК против шести генов нематоды, в экспериментах проявляли устойчивость, сопоставимую с присутствием у растений *R*-генов: снижение инфицированности растений доходило до 89%.

Далее приведены данные успешного применения технологии HIGS как потенциального инструмента борьбы с паразитическими нематодами. Интересные результаты получены при попытке использования HIGS в качестве мишени гена *M. incognita*, кодирующего PPN-эффектор Mi-MSP2, участвующий в супрессии защитного ответа растения-хозяина. Трансгенные растения, экспрессирующие такие дцРНК, характеризовались сниженной на 88% экспрессией гена-мишени у самок нематоды, а также уменьшенной на 80% продукцией яиц. Применение этой технологии для защиты растений баклажана показало, что дцРНК стабильно экспрессировалась в трансгенных формах вплоть до третьего поколения от самоопыления и обеспечивала высокий уровень защиты от нематоды. Для *M. incognita*, одного из наиболее опасных вредителей растений, обладающего широким кругом хозяев, экспериментально доказана эффективность HIGS для нескольких генов, включая PPN-эффекторы (снижение продуктивности самок нематоды составило 40-70%), ген стерол-связывающего белка (снижение продуктивности нематод до 50%), ген L-цистеиновой протеазы (снижение продуктивности на 60-80%), гены кутикулярного коллагена (снижение продуктивности нематод до 80%, структурные aberrации у личинок).

Развитие других видов нематод также может быть супрессировано с помощью HIGS. Отмечено снижение продуктивности самок *H. schachtii* на трансгенных растениях, экспрессирующих дцРНК сложной структуры, содержащую сегменты генов эндоглюканазы и белка MSP (major sperm protein); кроме того, показана возможность применения HIGS для *Heterodera glycines*, *Bursaphelenchus xylophilus* и других видов нематод. Свекловичная цистообразующая нематода *H. schachtii* также служит примером актуальности разработки новых генетических технологий биологического контроля. Этот паразит поражает более 200 видов растений, принадлежащих 98 родам, и является одним из основных вредителей сахарной свеклы. Яйца в цистах сохраняют жизнеспособность в почве в течение нескольких лет. Стандартные способы борьбы с помощью нематодицидов на основе фосфоорганических соединений и карбаматов затруднены из-за их высокой токсичности; применение в севообороте других видов растений, способных инициировать выход личинок из яиц, но не являющихся хозяевами для *H. schachtii*, экономически неэффективно для высокоинтенсивных технологий возделывания сахарной свеклы. Использование устойчивых форм растений также проблематично из-за их повышенной чувствительности к некоторым грибным патогенам, что в совокупности демонстрирует отсутствие эффективных способов борьбы и необходимость разработки новых технологий, к числу которых относится HIGS.

Применение технологии HIGS основано на получении генетически-модифицированных форм растений, которые не экспрессируют чужеродные белки, но производят некодирующую двуцепочечную РНК, содержащую участки мРНК гена-мишени, в данном случае гена нематоды. РНК-интерференцию, как и белок-кодирующие гены, активно применяют для супрессии генов растений. Поскольку при продукции некодирующей дцРНК не производятся новые для растения-хозяина белки, отсутствует вероятность развития у потребителей аллергических реакций или специфических изменений в метаболизме растений, связанных с новыми ферментативными или регуляторными активностями. К рискам применения таких растений в практике сельского хозяйства следует отнести потенциальную возможность неспецифического действия дцРНК на другие организмы, взаимодействующие с растениями, если их мРНК каких-либо генов содержат протяженные участки сходства. Дальнейшее систематическое исследование структуры геномов организмов разной принадлежности в различных природных и

агроэкосистемах, вероятно, позволит с точностью прогнозировать такие риски и откроет путь к инженерии устойчивости сельскохозяйственных растений к разнообразным вредителям и патогенам.

Вопросы:

- 1) Описать особенности карантинного вредителя – нематод и связанных с ними проблем в области защиты с/х-растений.
- 2) Привести примеры существующих методов защиты растений и их недостатки.
- 3) На каких стадиях борьбы растения с патогеном функционируют гены устойчивости?
- 4) Описать качественно новые методы на входе в практику – РНК-интерференцию и гетерологичный генетический сайленсинг.

Литература

1. Колчанов Н.А., Кочетов А.В., Салина Е.А., Першина Л.А., Хлесткина Е.К., Шумный В.К. Состояние и перспективы использования маркер-ориентированной и геномной селекции растений // Вестник РАН. 2017. 87. 348-354.
2. Кочетов А.В., Шумный В.К. Трансгенные растения как генетические модели для изучения функций генов // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016. 20. 476-481.
3. Жирнов И.В., Трифонова Е.А., Кочетов А.В., Шумный В.К. Вирус-индуцируемый сайленсинг как метод изучения функций генов высших растений // Генетика. 2015. 51. 558-567.
4. Кочетов А.В., Пронозин А.Ю., Шацкая Н.В., Афонников Д.А., Афанасенко О.С. Вироид веретенovidности клубней картофеля // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021. 25. 269-275.
5. Кочетов А.В., Гавриленко Т.А., Афанасенко О.С. Новые генетические технологии защиты растений от паразитических нематод // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021. 25. 337-343.

Дополнительная литература

6. Kochetov AV., Afonnikov D.A., Shmakov N., Vasiliev G.V., Antonova O.Y., Shatskaya N.V., Glagoleva A.Y., Ibragimova S.M., Khiutti A., Afanasenko O.S., Gavrilenko T.A. NLR Genes Related Transcript Sets in Potato Cultivars Bearing Genetic Material of Wild Mexican Solanum Species // Agronomy. 2021. 11. 2426.
7. Kochetov AV, Egorova AA, Glagoleva AY, Strygina KV, Khlestkina EK, Gerasimova SV, Shatskaya NV, Vasilyev GV, Afonnikov DA, Shmakov NA, Antonova OY, Alpatyeva NV, Khiutti A, Afanasenko OS, Gavrilenko TA. The mechanism of potato resistance to Globodera rostochiensis: comparison of root transcriptomes of resistant and susceptible Solanum phureja genotypes // BMC Plant Biol. 2020. 20(Suppl 1). 350.