

СТРАТЕГІЇ СТВОРЕННЯ СТІЙКИХ ДО ВІРУСІВ РОСЛИН: ФОКУС НА РНКАЗАХ

А. ПОТРОХОВ, О. ОВЧАРЕНКО*

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 03143, Україна

E-mail: ovcharenko077@gmail.com

На цей час у світі відомо близько шести з половиною тисяч видів вірусів, серед яких понад півтори тисячі — є фітовірусами. Більшість вірусів рослин здатні викликати епіфітотії, які призводять до зменшення врожайності, зниження якості продукції та, часом, ставлять цінні промислові сорти та навіть цілі види рослин під загрозу зникнення. Глобальне поширення вірусів веде до необхідності посилення фітосанітарних та карантинних обмежень, що потребує додаткових фінансових витрат. Розуміння принципів розповсюдження вірусів та їх біології є ключовим фактором для формування стратегій та методів боротьби з ними. Одним з новітніх підходів є використання технологій генетичної інженерії. Їх застосування дозволило створити низку сортів рослин з підвищеною стійкістю до вірусів. Проте, проблема створення вірусостійких рослин досі залишається однією з найактуальніших, оскільки з плином часу віруси набувають здатності обходити механізми захисту та існує потреба в отриманні нових стійких сортів. Існує декілька основних підходів, які дозволяють отримувати трансгенні рослини з підвищеною стійкістю до вірусів. Вони базуються на використанні: РНК-інтерференції; резистентності, пов'язаної з білками вірусної оболонки; резистентності, обумовленої впливом РНК-сателітів, антисмислових РНК, репліказ, РНК-залежної РНК-полімерази, дії рибонуклеаз, білків, що інактивують рибосоми, молотоподібних рибозимів, мікроРНК, рослинних антитіл. Одним з підходів до створення вірусостійких рослин є застосування генів рибонуклеаз. Гени, що кодують ці рибонуклеази мають різне природне походження та належать широкому колу організмів: бактеріям, грибам, рослинам, тваринам. Зокрема, екстраклітинні рибонуклеази здатні неспецифічно розрізати позаклітинні молекули вірусної РНК, що дозволяє створювати рослини з підвищеною стійкістю до різних фітовірусів.

Даний огляд присвячено дослідженню різних генно-інженерних підходів та перспективам їх використання для створення стійких до вірусів рослин. Акцент зроблено на дослідження впливу генів гетерологічних рибонуклеаз.

Ключові слова: віруси рослин, противірусний захист, стійкість до вірусів, трансгенні рослини, РНКази.

Вступ

Віруси як біологічні об'єкти є найпоширенішими на Землі (Mushegian et al, 2023). Вони уражують археї, бактерії, гриби, рослини, тварин та людей. Віруси, що уражують рослини, здатні викликати різноманітні симптоми на рослинах: мозаїки, згортання та деформації листків, зміну забарвлення листкових пластинок або появу на них штрихуватості (Bhattacharyya et al, 2015; Jiang et al, 2023). На противагу первинному, цілковито негативно-му, баченню вірусів, на сьогодні починають бачити їх важливу роль у біосфері, зокрема в контролі за перенесенням генів між видами, накопиченні біомаси та кругообігом елементів в екосистемах (Mushegian et al, 2023, Lefeuvre et al, 2019). Однією з функцій вірусів рослин у біосфері є контроль за надмірним зростанням гомогенних популяцій рослин (Lefeuvre et al, 2019), якими, проте, є і агроценози. Тут інтереси людини вступають в конфлікт з природними явищами та процесами, оскільки існує потреба в вирощуванні сільськогосподарських видів, як джерел продовольства і сировини. Прояви симптомів при ураженні вірусами будуть залежати від виду рослини, вірусу та стадії інфекційного процесу. Фітовіруси здатні порушувати метаболічні процеси (фотосинтез, дихання, обмін амінокислот та вугле-

водів), впливати на фізіологічний стан та розвиток рослини, що як наслідок призводить до зниження росту, врожайності, а в особливо тяжких випадках до загибелі рослинного організму (Gergerich et al, 2006; Jiang et al, 2023; Tatineni and Hein, 2023). Більше того, деякі віруси можуть вносити зміни в генетичний матеріал рослини, що призводить до втрати генетичної стабільності, посилення мутаційних процесів, рекомбінації та неконтрольованих генетичних змін (Hohn et al, 2008). Також доведено, що комбінована взаємодія вірусів з іншими стресовими факторами, такими як посуха, висока температура, дефіцит поживних речовин, може підсилити вплив вірусної інфекції і збільшити їх шкодочинність та сприяти їх глобальному поширенню (Prasad et al, 2022).

Триває пошук комплексних методів захисту рослин, які здатні зменшити негативний вплив вірусів. Переважно ці заходи спрямовані на контроль вірусних переносників та впровадження культури відповідальної агротехніки, що передбачає дотримання чітко прописаних регламентних робіт з дотриманням фітосанітарних норм, сівозмін, використання сертифікованого здорового посадкового матеріалу, тощо (Varma et al, 1993). Однак, існують і більш спеціалізовані методи захисту рослин, які насамперед пов'язані з отриманням нових стійких видів та сортів (Rubio et al, 2023; Sheat et al, 2023; Rashid et al, 2016). Прикладами таких методів можуть бути спеціальні селекційні програми, в основі яких лежить як використання природних донорів стійкості в межах одного виду для отримання нових сортів (Rubio et al 2023), так і методи пов'язані з безпосередньою зміною геному рослин шляхом створення трансгенних рослин (Rashid et al, 2016).

Трансгенні рослини — це рослини, геноми яких було змінено за допомогою методів генетичної інженерії шляхом інтеграції чужорідного гена або інактивації певного гена організму. Ще у 1983 році було вперше створено трансгенну рослину тютюну, що містила бактеріальний ген стійкості до антибіотику канаміцину (*nptII*) (Bevan et al, 1983). Ця технологія відкрила нову еру розвитку молекулярної біології та генетичної інженерії. З того часу основним аспектом генетичної інженерії рослин є отримання широкого спектру моди-

фікованих сільськогосподарських видів з важливими агрономічними ознаками. До таких ознак відносять стійкість до різних факторів навколишнього середовища, як абіотичного (посуха, засолення ґрунтів, низькі температури), так і біотичного характеру (шкідники, бактерії, віруси) (Verma et al, 2022).

Фітопатогенні вірусні інфекції можуть вражати як декоративні, так і культурні рослини, викликаючи глибокі незворотні зміни в рослинах, що призводять до погіршення адаптаційних властивостей рослин (Jiang et al, 2023; Tatineni and Hein, 2023). Як наслідок в інфікованій рослині фітопатогени можуть репродукуватися впродовж усього періоду існування рослинного організму та утворювати резервуар збудників вірусних захворювань. Таким чином збільшується коло уражених рослин, що посилює і без того високий інфекційний фон.

У цьому огляді розглянуто загальні принципи створення стійких до вірусів рослин, зокрема за допомогою генетично-інженерних методів. Основну увагу приділено дослідженню впливу гетерологічних РНКаз на підвищення стійкості рослин до вірусів.

Нескінченне змагання між вірусами та рослинами

У природних умовах рослини можуть виявляти стійкість до фітопатогенів, зокрема і вірусів. Існує декілька основних реакцій рослини на вірусну інфекцію. Серед них виділяють: не залежну від рослини-господаря стійкість першого типу — цілковиту резистентність, або імунність, яка полягає в природних властивостях не уражуватися певними вірусами і обумовлена власне генотипом рослин. Часто вона запобігає потраплянню патогена у клітину та пов'язана з анатомічною будовою органів рослини: наявні потовщені кутикула або клітинна стінка, густе опушення, біосинтез захисних вторинних метаболітів, тощо. Цей тип стійкості, зазвичай, не демонструє жодних ознак вірусного ураження. Це резистентність широкого спектру, що забезпечує захист проти всіх штамів патогена, який є інфекційним для інших видів рослин (Eleftherianos et al, 2022. Wang et al, 2020).

Оскільки вірусам рослин необхідно подолати фізичний бар'єр клітинної стінки, вони

проникають у клітини хазяїна або шляхом механічної інокуляції, або інфекція опосередковується векторами, такими як комахи, нематоди або навіть гриби. Пряме розпізнавання вірусів, ймовірно, не відбувається в апопласті, а на цитоплазматичних мембранах. За умови, що вірус здатний подолати первинні механічні бар'єри, відбувається його розпізнавання через специфічні структури або білки, які асоціюються з патогеном. Цей тип стійкості веде до виникнення некрозів у місці інфікування, які запобігають подальшому системному поширенню вірусу по рослині. Розпізнавання патоген-асоційованих молекулярних структур (Pathogen Associated Molecular Patterns – PAMPs), відбувається за допомогою рецепторів розпізнавання (Pattern Recognition Receptors – PRRs) на плазматичних мембранах рослин. Ці PRR розпізнають консервативні структури патогенів та індують так звану реакцію імунітету, що пов'язана з патогеном. Крім того, є повідомлення про можливу участь внутрішньоклітинних рецептороподібних кіназ (Receptor Like Kinases – RLK), подібних до тих, які беруть участь у розпізнаванні PAMP за допомогою PRR, у взаємодії рослин і вірусів (Ronde de et al, 2014).

Остаточні механізми процесів, які викликають резистентність у рослин, ще не з'ясовані. Однак, в рослинах визначено так звані R гени, які вмикають системи захисту рослин та реагують на потрапляння патогенів в рослину (Akhter et al, 2021). Така система отримала назву вродженої «імунної системи» (Ausubel et al, 2005). Ймовірно, вона виникла внаслідок коєволюції патоген-рослина. У процесі запуску імунної сигнальної мережі рослин відбувається інтенсивний обмін сигналами та розпізнавання (див. огляд Ding et al, 2022). Механізми стійкості до вірусів можуть бути пов'язані з білками, які розташовані як на зовнішніх мембранах, так і всередині клітини. Події розпізнавання патогена переважно опосередковані класом рецепторних білків, які містять нуклеотидзв'язувальні (Nucleotide-Binding domain – NB) домени та багаті лейцином повтори (Leucine Rich Repeats – LRR). Ці рецепторні білки розпізнають власне патоген-асоційовані патерни (PAMP) або молекулярні структури асоційовані з пошкодженнями, викликаними пато-

геном (Damage Associated Molecular Patterns – DAMP). Є також внутрішньоклітинні, так звані NLR (Nucleotide-Binding Domain and Leucine-Rich Repeat) рецептори, які як і попередні мають NB та LRR ділянки. NLR рецептори розпізнають специфічні фактори авірулентності (Avr), що обумовлені патогенами. Відповідно до будови N-кінцевого домену NLR поділяють на два основні класи: TIR (Toll/interleukin-1 рецептор) та CC (Coiled Coil спіральна спіраль домен) (Monteiro and Nishimura, 2018). Існує думка, що активна фракція цих протеїнів може знаходитися в клітинному ядрі (Dodds, Rathjen, 2010). Саме NLR рецептори вважають молекулярними перемикачами, які запускають сигнал захисній системі рослини після виявлення патогена (Takken et al, 2006). Активація NLR запускає так званий процес гіперчутливості (Hypersensitive Response – HR), що проявляється у вигляді локальної загибелі клітин, а отже некрозів (Balint-Kurti, 2019). Реакція HR, що ініціюється взаємодією білків Avr/R призводить до метаболічних змін рівнів захисних регуляторів росту рослин. Підвищуються вміст саліцилової кислоти (SA), жасмонової кислоти (JA) і оксиду азоту (NO), накопичуються активні форми кисню (АФК), такі як O_2^- і перекис водню, як в інфікованих, так і в неінфікованих тканинах. Це, власне, і веде до некрозів (Mandadi, Scholthof, 2013).

Селекційні програми, які направлені на створення вірусостійких рослин засновані, переважно, на отриманні стійких сортів за рахунок схрещування з рослинами природними донорами стійкості. R-ген опосередкована стійкість є видоспецифічною та індукується, коли штам-специфічний ефектор авірулентності (Avr) від патогена поєднується прямо або опосередковано зі спорідненим рослинним білком R (Zhu et al, 2013; Mandadi, Scholthof, 2013). R-білки, що забезпечують захист від бактерій, грибів, ооміцетів, нематод, комах і вірусів, були ідентифіковані в різних видах рослин. Неповний перелік виявлених рослинних генів, що обумовлюють резистентність до вірусів, наведено у табл. 1. Більшість відомих R-білків належать до класу спіральна спіраль (CC) – сайт зв'язування нуклеотидів (NBS) – багаті лейцином повтори (LRR)), або до класу рецепторів Toll Interleukin 1 (TIR)-NBS-LRR. Перший ген

резистентності N, що був ідентифікований у тютюнів, належить до генів класу гомологічного рецептора Toll Interleukin 1 (TIR)-NBS-LRR. Цей ген надає стійкість до широкого кола тобамовірусів (Marathe et al, 2002). Переважно гени резистентності впливають на процеси транскрипції вірусів, наприклад, ген eIF4E, який є фактором ініціації транскрипції, бере участь в механізмах противірусного захисту рослин та пов'язаний із впливом на утворення VPg (вірусного геномзв'язаного білка) (Perez et al, 2012), а домінуючий ген *Rx1* блокує транскрипцію на рівні елонгації (Richard et al, 2020). Більшість R-генів кодує внутрішньоклітинні імунні рецептори NLR-типу. Ці рецептори потребують допоміжних NLR для активації імунної сигналізації при сприйнятті патогена – NRC. Багато R генів у родині Solanaceae, включаючи NLR є температурола-

більними. Стійкість, надана цими генами, в багатьох випадках чутлива до температури та знижується при перевищенні 28 °C. Проте виявили, що стійкість до PVX, обумовлена *Rx1*, зберігалася при підвищених температурах (до 34 °C) у рослинах картоплі та *Nicotiana benthamiana*, які стабільно експресували *Rx1*. Те, що *Rx1*-імунний сигнальний шлях не залежав від температури, означає, що принаймні один допоміжний NRC у *N. benthamiana* є стійким до температури. Автори припустили, що температурна чутливість функціонування генів резистентності пасльонових, ймовірно, пов'язана з сенсором NLR (Richard et al, 2020). Іноді для функціонування стійкості потрібно, щонайменше 5 різних протеїнів, як у випадку RTM стійкості у *Arabidopsis thaliana* (Cosson et al, 2012).

R гени стійкості є потенційними кандидатами при створенні генетичних конструкцій,

Таблиця 1. Рослинні гени стійкості до фітопатогенів

Ген стійкості	Рослина	Віруси	Посилання
<i>RCY1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CMV*	Sekine et al, 2008
<i>RTM1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TEV*	Cosson et al, 2012
<i>RTM2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TEV*	Cosson et al, 2012
<i>HRT</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TCV*	Zhu, 2013
<i>pot-1</i>	<i>Capsicum annuum</i>	PVY*, TEV*	Parrella et al, 2002
<i>pvr2</i>	<i>C. annuum</i>	PVY*	Ruffel et al, 2005
Ортолог гена пшениці <i>Sbm2</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	SBWMV*	Okada et al, 2020
<i>N</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	TMV*	Holmes et al, 1938 цит. по Marathe et al, 2002
<i>RT4-4</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	CMV*	Seo et al, 2006
<i>cyv1</i>	<i>Pisum sativum</i>	CIYVV*	Taninaka et al, 2020
<i>pot-1</i>	<i>Solanum lycopersicum</i> перенесено з <i>L. hirsutum</i>	PVY*, TEV*	Parrella et al, 2002
<i>Tm-2²</i>	<i>Solanum lycopersicum</i> перенесено з <i>S. peruvianum</i>	ToMV*, TMV*	Lanfermeijer et al, 2004
<i>Tm-1</i>	<i>Solanum lycopersicum</i> перенесено з <i>S. habrochaites</i>	TMV*, ToMV*, ToBRFV*	Jewehan et al, 2022
<i>SW-5b</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	TSWV*, TCSV*	Zhu et al, 2017
<i>eIF4E</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	PVY*	Ruffel et al, 2002
<i>Rx1</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	PVX*	Shaikhaldein et al, 2018
<i>Rx2</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	PVX*	Shaikhaldein et al, 2018
<i>Ry_{sto}</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	PVY*	Grech-Baran et al, 2020
<i>CMD2</i>	<i>Manihot esculenta</i>	CBSV*, CasMV	Sheat, Winter 2023

Примітка.* CBSV – Cassava brown streak virus, CasMV – Cassava mosaic virus, CIYVV – Clover yellow vein virus; CMV – Cucumber mosaic virus; CVV – Citrus variegation virus; PVX – Potato virus X, PVY – Potato virus Y; SBWMV – Soil-borne wheat mosaic virus; TCSV – Tomato chlorotic spot virus; TCV – Turnip crinkle virus; TEV – Tobacco etch virus; TMV – Tobacco mosaic virus; ToBRFV – Tomato brown rugose fruit virus; ToMV – Tomato mosaic virus; TSWV – Tomato spotted wilt orthotospovirus; TSWY – Tomato spotted wilt orthotospovirus.

придатних для отримання стійких до вірусів рослин. Гени резистентності бувають домінантними (більшість) та рецесивними. Імунітет, обумовлений рецесивними генами, має в своїй основі несумісність компонентів господаря та вірусу або факторів, які повинні взаємодіяти один з одним для розмноження вірусу в клітинах господаря та індукування інфекції в рослині (Johnson et al, 2020). Для створення генетичних конструкцій, що надають рослинам стійкість до вірусів, використовують домінантні гени резистентності. Рецесивні гени стійкості можуть становити інтерес як модель для генетичного редагування.

Встановлено, що у відповідь на вірусну інфекцію рослини синтезують різноманітні противірусні білки такі як: РНК-зв'язуючі білки (RNA binding proteins — RBPs), інактивуючі рибосоми білки (Ribosome inactivating proteins — RIPs), PR-білки (Pathogenesis Related), які можуть функціонувати як супресори вірусів, ферментні білки — РНКаз (Musidlak et al, 2017). Доведено, що у відповідь на вірус PR-білки здатні накопичуватися в незаражених органах, тим самим блокуючи його подальше поширення, а ферментативно активні білки РНКаз можуть виконувати функції «кіллерних» білків, попереджуючи реплікацію геномної РНК (MacIntosh et al, 2020).

В проведених дослідженнях було виявлено різні типи PR білків та встановлено функції багатьох з них. Так, білки PR2a та PR3 з *Nicotiana tabacum* переважно мають протигрибкову активність, але було помічено, що вони також можуть проявляти захисну активність проти вірусу тютюнової мозаїки (TMV) (Sindelarova M, Sindelar L, 2018). Крім того, встановлено, що виділений з *Capsicum annuum* білок PR10 (CaPR-10) виявляє рибонуклеолітичну активність щодо TMV. Виявили, що фосфорилювання деяких PR білків, зокрема PR10, може посилювати їх противірусну активність (Park et al, 2003; детальніше огляд Ali et al, 2018).

Досліджуючи властивості PR-білків можна не лише розробляти ґрунтовні селекційні антивірусні програми, а й використовувати їх для отримання трансгенних рослин, адже PR-білки є можливими генами-кандидатами для створення вірусостійких трансгенних культур (Saez et al, 2022).

На сьогодні, використання різноманітних методів біоінформатики таких як: вирівнювання множинних послідовностей, пошук у BLAST, філогенетичний аналіз та дослідження доменів і послідовностей ДНК, відіграє важливу роль у виявленні нових генів, асоційованих зі стійкістю до патогенів, та передбаченні їх можливого впливу на рослинний організм (Kumar et al, 2017).

Певний час, лише селекція природньо стійких рослин була оптимальним напрямком захисту від фітовірусів. Окрім селекції стійких генотипів рослин, звільнити рослини від вірусів можна використовуючи культуру апікальних меристем *in vitro*. Принцип функціонування якої, як довгий час вважали, полягав у відставанні зони реплікації вірусів від зони росту меристеми (Hollings, 1965; Grout, 1999; Alam et al, 2013; Wang et al, 2021). Окрім того, багато вірусів не здатні до вертикального перенесення до нащадків рослини-господаря через насіння. Меристематичні та трансгенераційні антивірусні бар'єри досі залишаються не до кінця дослідженими, проте, згідно з сучасними уявленнями вони значною мірою пов'язані з явищем РНК інтерференції. Отже, крім морфологічних бар'єрів, саме РНК-інтерференція (RNAi) відіграє вирішальну роль у запобіганні або дозволі інвазії меристеми або вертикальної передачі. Спосіб взаємодії вірусу з шляхами RNAi в рослинній меристемі, впливає на його симптоматику, персистенцію, швидкість реплікації та, зрештою, надходження в потомство господаря (Bradamante et al, 2021). Тому ці дослідження також важливі для розуміння механізмів взаємодії рослина-вірус і побудови захисних стратегій.

Стратегії створення вірусостійких рослин

На сьогодні використання сучасних молекулярно-біологічних та генно-інженерних підходів дозволяє розширити арсенал боротьби з рослинними вірусами (Salgotra et al, 2020). Розглядаючи спеціалізовані направлені зміни в геномі рослин для створення вірусостійких рослин можна виділити декілька основних стратегій розвитку цього напрямку генетичної інженерії, які представлені в табл. 2. Початкові спроби створити генетичні конструкції, що надають стійкість до вірусу, базувалися на

Таблиця 2. Деякі стратегії створення стійких до вірусів рослин з використанням генно-інженерних методів

Механізм/стратегія	Родини рослин	Продукти/механізми, що блокують віруси	Віруси	Посилання
Поверхневі білки капсиду	<i>Caricaceae</i> , <i>Cucurbitaceae</i> , <i>Fabaceae</i> , <i>Orchidaceae</i> , <i>Rosaceae</i> , <i>Solanaceae</i>	Посттранскрипційне замовкання генів; siRNA	CMV, TMV, PVY, CymMV, ORSV, BMV, PLRV, PPV, PRSV, WMV, ZYMV	Див. огл. Prins et al, 2008; Lindbo, Falk 2017; Ovcharenko, Rudas, 2023
Блокування реплікази	<i>Musaceae</i> , <i>Solanaceae</i>	Дефектні гени реплікази, РНК сайленсинг	BBTV, TYLCV, CMV, TMV	Golemboski et al, 1990; огляди Prins et al, 2008; Johnson et al 2020
РНК залежна РНК полімераза	<i>Solanaceae</i>	Ген, що кодує вірусну РНК залежну РНК полімеразу, ситрез коротких кРНК та подальша інактивація вірусу шляхом сайленсингу	TMV, джемінівіруси	Xie 2001; Gupta et al, 2021
РНК інтерференція	<i>Brassicaceae</i> , <i>Fabaceae</i> , <i>Solanaceae</i>	Малі інтерферуючі РНК/мікроРНК (siRNA/miRNA), РНК індукований комплекс сайленсингу (RISC), комплементарне спарювання siRNA/miRNA з цільовим геном, розщеплення вірусного гена білком аргонавт (AGO)	BBrMV, BBTV, BYDV, CasMV, CMV, CTV, MDV, MSV, MYMIV, PLRV, PNRV, PRSV, PVX, PVY, RTBV, SCMV, SMV, TCSV, TLCDV, TMV, TYLCV, WSMV	Див. огляди Li and Wang, 2019, Teixeira 2021; Akbar 2022, Liu et al, 2022
РНК сателіти	<i>Solanaceae</i>	siRNA, РНК інтерференція	CMV	Shen 2015
Гетерологічні рибонуклеази	<i>Asteraceae</i> , <i>Fabaceae</i> , <i>Poaceae</i> , <i>Solanaceae</i>	Внутрішньо- та позаклітинні РНКаз	BCMV, BPMV, BSMV, CMV, CSVd, PSTVd, PVY, RBSDV, SMV, TEV, TSWV, WMV	Детальніше див. Табл. 3
Білки інактиватори рибосом	<i>Cannabaceae</i> , <i>Caricaceae</i> , <i>Cucurbitaceae</i> , <i>Fabaceae</i> , <i>Solanaceae</i>	Аденін полінуклеотид глюкозилазна активність, інгібування трансляції кепованої РНК	ACMV, AMCV, AMV, BMV, BYMV, ChiVMV, CMV, ICRSV, PLRV, PMV, PRSV, PVX, PVY, SBMV, SHMV, SPMV, TBSV, TEV, TMV, TNV, TuMV, ZYMV	Див. огляд Citores et al, 2021
МікроРНК	<i>Solanaceae</i> , <i>Poaceae</i>	мікроРНК	BNYVV, BYDV, RSV, SCBGAV	Див. огляд Mengistu, Tenkegn, 2021

Механізм/стратегія	Родини рослин	Продукти/механізми, що блокують віруси	Віруси	Посилання
"Антитіла рослин"	<i>SBetaceae, Rutaceae, Solanaceae</i>	ScFv- антитіло, фрагменти антитіл ScFv	AMCV, ArMV, BNYVV, CMV, CYVV, JMV, PVY, TBSV	Tenkegna, 2021 Див огляд Safarnejad et al, 2011; Jafarzade et al, 2019
CRISPR-Cas9	<i>Solanaceae</i>	Транз'єнтна експресія sgRNA та Cas9 ендонуклеази, які вносять двуниткові розриви в ДНК вірусів	BCTV, BSCTV, BeYDV, MeMV	Див. огляд Gupta et al, 2021

Примітка. CMV – *African cassava mosaic virus*, AMCV – *Artichoke mottled crinkle virus*, AMV – *alfalfa mosaic virus*, ArMV – *Arabidopsis mosaic virus*, BBrMV – *Banana bract mosaic virus*, BBTV – *Banana bunchy top virus*, BCMV – *Bean common mosaic virus*, BCTV – *Beet curly top virus*, BMV – *Barley mosaic virus*, BNYVV – *Beet necrotic yellow vein virus*, BPMV – *Bean pod mottle virus*, BSCTV – *Beet severe curly top virus*, BSMV – *Barley stripe mosaic virus*, BYDV – *Barley yellow dwarf virus*, BeYDV – *Bean yellow dwarf virus*, BYMV – *Bean yellow mosaic virus*, CasMV – *Cassava mosaic virus*, ChiVMV – *Chilli vein mottle virus*, CSVd – *Chrysanthemum stunt viroid*, CTV – *Citrus tristeza virus*, CMV – *Cucumber mosaic virus*, CymMV – *Cymbidium mosaic virus*, ICRSV – *Indian citrus ringspot virus = citrus ringspot virus*, CRSV, CYVV – *Clover yellow vein virus*, JMV – *Johnson grass mosaic virus*, MDV – *Maize dwarf virus*, MeMV – *Merremia mosaic virus*, MSV – *Maize streak virus*, MYMIV – *Mungbean yellow mosaic India virus*, ORSV – *Odontoglossum ringspot virus*, PLRV – *Potato leaf roll virus*, PMV – *Pokeweed mosaic virus*, PNRV – *Prunus necrotic ringspot virus*, PPV – *Plum pox virus*, PRSV – *Papaya ringspot virus*, PSTVd – *Potato spindle tuber viroid*, PVX – *Potato virus X*, PVY – *Potato virus Y*, RBSDV – *Rice black-streaked dwarf virus*, RSV – *Rice stripe virus*, RTBV – *Rice tungro bacilliform virus*, SCBGAV – *Sugarcane Bacilliform Guadeloupe A Virus*, SCMV – *Sugarcane mosaic virus*, SMV – *Soybean mosaic virus*, TBSV – *Tomato bushy stunt virus*, TCSV – *Tomato chlorotic spot virus*, TEV – *Tobacco etch virus*, TLCDV – *Tomato leaf curl burewala virus*, TLCDV – *Tomato leaf curl Delhi virus*, TMV – *Tobacco mosaic virus*, TNV – *Tobacco necrosis virus*, TSWV – *Tomato spotted wilt virus*, TuMV – *Turnip mosaic virus*, TYLCV – *Tomato yellow leaf curl virus*, SBMV – *Southern bean mosaic virus*, SHMV – *Sunn-hemp mosaic virus = Sunn-hemp rosette virus*, SPMV – *Satellite panicum mosaic virus*, WMV – *Watermelon mosaic virus*, WSMoV – *Watermelon silver mottle virus*, WSMV – *Wheat streak mosaic virus*, ZYMV – *Zucchini yellow mosaic virus*

концепції резистентності, отриманої від патогенів (Kyryuchenko, Kovalenko, 2018), що полягало у використанні генетичних послідовностей пов'язаних з капсидними, транспортними або білками реплікази вірусів. В подальшому виявили, існування різноманітних механізмів, які впливають на РНК вірусів і призводять до замовкання генів, що також є ефективними для створення стійких рослин (Sehrish et al, 2022).

Першою і найбільш поширеною стратегією є отримання вірусостійких трансгенних рослин заснованих на феномені, якій отримав назву патоген-обумовленої резистентності (Pathogen Derived Resistance – PDR). В клітини таких рослин переносять закодовані послідовності

окремих вірусних білків, або безпосередньо нуклеїнових кислот вірусів (Beachy, 1989).

Серед вірусних білків найбільшу увагу зосереджено на репліказах, протеазах, транспортних та капсидних білках. Однак, нині відомо, що розвиток PDR можливий і за рахунок наявності власне самої вірусної РНК, що дає нові можливості, що базуються на РНК-опосередкованій стійкості. Однак, навіть зараз вчені не мають чіткого розуміння всіх молекулярних механізмів утворення стійкості за рахунок PDR (Rashid, Lateef, 2016; Andersen et al, 2018).

Перші спроби створення вірусостійких трансгенних рослин заснованих на феномені PDR почалися з використання TMV і його кап-

сидного білка (Nejdat, 1989). Використання капсидних білків показало свою високу ефективність, проте, зазвичай, така стійкість є вузькоспеціалізованою (Prins et al, 2008). Було висунуто припущення, що це саме білок-опосередкована стійкість, оскільки трансгенні рослини мали високу стійкість при інокуляції віріонами, але не вірусною РНК. Проте, іноді при застосуванні послідовностей капсидних білків для генетичної трансформації рослин, отримана резистентність буває обумовленою явищами РНК інтерференції (див. огляд Ovcharenko, Rudas, 2023).

Окрім білка оболонки часто можна зустріти застосування іншого типу білків – транспортних. Специфічно модифікуючи клітинні плазмодесми, ці білки дозволяють інфекції поширюватися між сусідніми клітинами, а згодом, потрапляючи у провідні системи рослин, забезпечують системне поширення вірусів по всьому організму (Lapidot et al, 1993; Conti et al, 2012)). При створенні трансгенних рослин, які містили мутантні форми транспортних білків вірусів, виявилось, що отримані рослини були більш стійкими до вірусних інфекцій. Такий підхід потенційно дозволяє отримувати трансгенні рослини, які б проявляли стійкість одразу до декількох вірусів, оскільки транспортні білки можуть використовуватися спорідненими вірусами (Lapidot et al, 1993; Prins et al, 2008).

Іншим типом захисту є експресія повних або неповних генів вірусних репліказ, що сприяє розвитку стійкості до інфекції, котра, як правило, обмежується штамом вірусу, ген реплікази якого використовується. Вважають, що репліказа, експресована у рослинах, зв'язується з білками господаря або вірусу, які регулюють реплікацію та експресію генів вірусу (Prins et al, 2008). Цікаво, що ця стратегія є ефективною навіть для забезпечення стійкості проти одноланцюгових ДНК вмісних вірусів, таких як джемінівіруси (Gupta et al, 2021).

Іншим способом створення стійких рослин є використання явища РНК інтерференції. Розрізання двохланцюгових РНК вірусів (double stranded RNAs – dsRNAs) на короткі інтерферуючі РНК (short interfering RNAs – siRNAs) або мікро РНК (micro RNAs – miRNAs) (Akbar et al, 2022), ініціює в організмі рослини про-

цеси мовчання генів та унеможливорюють подальший розвиток вірусної інфекції. Це відбувається за рахунок розпізнавання рослинами дволанцюгових ділянок РНК, внаслідок чого відбувається їх руйнування рослинними комплексами Dicer та RISC, що руйнують вірусні РНК. При трансформації рослини фрагментом ДНК у вигляді інвертованих повторів або комплементарним РНК вірусу відбувається активація захисних систем, які руйнують РНК вірусу (Younis et al, 2014). Цікаво, що паретро- та ДНК-віруси рослин, такі як каулімовіруси та джемінівіруси, також є мішенями сайленсингу (Rodríguez-Negrete et al, 2019). Припускають, що механізм мовчання генів є надзвичайно поширеним природним захисним механізмом рослин, що може бути активно використаний в генетичній інженерії.

Використання антизмислової РНК, мікро-РНК та косупресії дозволяє спонукати розвиток мовчання генів. Завдяки явищу мовчання генів стало можливим створення мультистійких рослин (Yang, Li, 2018). Детально молекулярні механізми, що обумовлюють індуковане господарем мовчання генів описане в огляді Zand Karimi H, Innes RW (2022). У противірусному імунітеті, опосередкованому сайленсингом РНК, є два основних механізми захисту рослин від вторгнення вірусних нуклеїнових кислот: транскрипційне мовчання генів (Transcriptional Gene Silencing – TGS) та посттранскрипційне мовчання генів (Post Transcriptional Gene Silencing – PTGS). TGS діє на ДНК вмісні віруси, пригнічує транскрипцію цільових локусів, контролюючи статус метилювання хроматину та утворення гетерохроматину. PTGS спрацьовує як захисний механізм проти РНК- і ДНК-вмісних вірусів та діє на посттранскрипційному рівні, спрямовуючи мішені мРНК до деградації або пригнічення трансляції. Деякі віруси з широким колом господарів мають різні стратегії пригнічення противірусного захисту, обумовленого РНК-сайленсингом господаря. Вірусні супресори сайленсингу можуть перешкоджати або зменшувати ефективність PTGS та TGS. Вони також можуть впливати шляхом активації або індукції експресії ендегенних супресорів. Імносупресивна діяльність деяких вірусів може пояснити їх широкий спектр хазяїв і поставити

під загрозу успіх стратегій на основі siRNA (Teixeira et al, 2021), але, в той же час, вона відкриває можливість створення стратегій направлених проти вірусних супресорів сайленсингу (детальніше в оглядах Scaria et al, 2006; Pumplin N, Voinnet O (2013); Singh et al, 2015; Yang, Li, 2018). Саме на вірусні супресори сайленсингу рослин може впливати (пригнічувати) використання сателітних РНК (satRNA) (Shen et al, 2015). Проте, Y-Sat (satRNA) вірусу огіркової мозаїки (CMV) можуть відігравати і іншу роль окрім тієї, що послаблюють симптоми вірусної інфекції: деякі з них, додатково навантажуючи AGO1, сприяють розщепленню ендогенної мРНК і самі викликають захворювання (Flores, 2016).

Ще одним підходом створення стійких рослин є використання білків-інактиваторів рибосом (Citores et al, 2021). Ці білки блокують рибосомальну одиницю 28S РНК. Так вже була детектована низка таких білків: MAP (у рослинах *Mirabilis jalapa*), Trichoxanthin (у рослинах *Trichoxanthes kirilowi*), Dianthin (у рослинах *Dianthus caryophyllus*), Momorcharin (у рослинах *Momordica cacharantia*), CA-SRI (у рослинах *Clerodendrum aculeatum*), Ricin (у рослинах *Ricinus communis*).

Рибозими — це молекули РНК, які мають власну каталітичну активність для високо-специфічного гідролізу нуклеїнових послідовностей, яка інгібує експресію генів. Завдяки такому підходу було створено рослини дині стійкі до WMV2 and ZYMV (Huttner et al, 2001).

Цікавим підходом до створення стійких рослин є використання «рослинних антитіл». Хоча, рослини не мають власної повноцінної імунної системи, однак за допомогою методів генетичної інженерії можливе перенесення генів, що відповідають за синтез антитіл. Показано, що рослини тютюну, в яких синтезувалися антитіла до поверхневого білка вірусу ризоманії буряку, виявилися стійкими при їх інфікуванні шляхом механічного пошкодження та при інфікуванні через природний вектор *Polymyxa betae* (Jafarzade et al, 2019). Цікаво, що антитіла в рослинах для нормального функціонування повинні формувати сульфгідрильні містки, які можуть утворюватися в апопласті, або ендоплазматичному ретикулумі, але не цитоплазмі. Проте, оскільки при транспорті в

ендоплазматичний ретикулум антитіла виявляються відокремленими від вірусів, то перспективним є їх поєднання з сигналами апопластного транспортування (Safarnejad et al, 2011).

Окрім вищезазначених підходів, існує що низка альтернативних стратегій забезпечення вірусостійкості у трансгенних рослин. Наприклад, один з таких підходів — це використання генів природної стійкості рослин, що кодуєть вище зазначені PR білки, для генетичної трансформації гетерологічних видів. Іншим досить перспективним підходом є індукція стійкості шляхом сайленсингу рослинних генів, необхідних для реплікації вірусу. Існують навіть стратегії що включають використання генів білків ссавців, таких як інтерферон (Vincente et al, 1987) та генів, що інактивують роботу рибосом. Ще одним із підходів, про який ми поговоримо більш детально, є використання генів гетерологічних рибонуклеаз.

Рибонуклеази рослин

РНКазы — це ферменти, що гідролізують фосфодиефірний зв'язок у молекулах РНК. Переважно вони локалізовані в органелах або в позаклітинному просторі. РНКазы можуть бути розділені на 3 родини: РНКазы А (хребетні), РНКазы Т1 (бактерії, гриби) і РНКазы Т2 (віруси, бактерії, гриби, рослини, тварини). У більшості організмів є лише один ген такого ферменту, однак у рослин генів може бути декілька, окрім того їх РНКазы можуть бути пристосовані для різноманітних функцій. Рослинні РНКазы відносять до родин так званих РНКаз Т2 типу, які часто є секреторними та транспортуються в апопласт, вакуолі, чи депонуються в ендоплазматичному ретикулумі (Green, 1994; MacIntosh, Castandet, 2020). Ферменти з цієї родини є ендорибонуклеазами, які неспецифічно розщеплюють РНК за рахунок роботи активного центру ферменту, який містить консервативні залишки гістидину. Їх ферментативний механізм є двоступеневим і включає трансфосфорилування та гідроліз. РНКазы цього типу також можуть зустрічатися у великої кількості бактерій, грибів та навіть деяких вірусів та тварин (Kumar, Kanwar, 2020).

Філогенетичний аналіз дозволив розділити РНКазы Т2 типу на три класи (Deshpande, Shankar, 2002):

- I клас — це білки пов'язані з різноманітними відповідями на абіотичний та біотичний стрес. Цей клас характеризується значною мінливістю;

- II клас — це консервативний клас РНКаз виявлений у насінневих рослин. Функції ферментів цього класу пов'язані із реутилізації РНК;

- III клас — головним чином пов'язаний із самонесумісністю, ферменти цього класу було названо S-РНКазами, тоді як інші рослинні ферменти родини T2 є S-подібними РНКазами.

Встановлено, що вміст рибонуклеаз здатний значно збільшуватися при стресових умовах. Так, виявили відмінність в активності РНКаз та їх динаміці при аналізі двох сортів гречки, які мають різну чутливість до вірусу опіку гречки (BBV): у сорту з середньою чутливістю до вірусу РНКазна активність коливалася з моменту інфікування вірусом, тоді як у толерантного сорту — поступово зростала. (Sindarovska et al, 2014). Також показано, що у рослин арабідопсису як відповідь на стрес, зокрема спричинений впливом фосфатного голодування, індукується екстраклітинна рибонуклеаза RNS1, яка локалізується не лише в місці поранення, а й в віддалених непошкоджених тканинах (Bariola et al, 1999).

Для генетичних досліджень пов'язаних зі створенням вірусостійких трансгенних рослин інтерес становляють саме S-подібні РНКазы рослин, що належать до неспецифічних ендорибонуклеаз. Ймовірно, що S-подібні РНКазы у рослин індуються при старінні, оскільки цей процес характеризується деградацією макромолекул, зокрема РНК, і зниженням фотосинтетичної активності. Поранення також є індуктором активації позаклітинних РНКаз, котрі розщеплюють РНК для повторного використання фосфатів навколишніми клітинами. Багато генів позаклітинних S-подібних РНКаз експресуються у квітах. Вони виробляються в клітинах маточок і секретуються в позаклітинний матрикс (Kumar, Kanwar, 2020). Незважаючи на той факт, що тканини квітів багаті поживними речовинами, вони майже не ушкоджуються збудниками хвороб. Це узгоджується з високим рівнем рибонуклеазної активності у квітах, тому було припущено, що така активність пов'язана з захистом квітів від

патогенів. Компоненти апопласту відіграють ключову роль на початкових етапах взаємодії рослин та патогенів. Позаклітинні РНКазы можуть потенційно брати участь у протидії вірусам, завдяки позаклітинній локалізації. Ці ферменти мають низький рівень активності в інтактних листках та індуються у відповідь на поранення та проникнення збудника (Sangaev et al, 2011).

Точний механізм антивірусного захисту рослин за допомогою РНКаз ще не відомий, однак виділяють три можливих механізми їх впливу на РНК вірусів, які можуть проявлятися на будь-якій стадії клітинної інфекції. На першому етапі, коли РНКаз зустрічає вірус поза клітиною, вона може знищити вірусну РНК, хоча сам механізм проникнення РНКазы всередину віріону незрозумілий і потребує подальших досліджень. Проте доведено, що інфекційність вірусу зменшується при безпосередній обробці частинок вірусу РНКазою (Bald, 1964). На наступному етапі РНКазы може взаємодіяти з вірусом у цитоплазмі в ендоплазматичному ретикулумі (Verchot, 2016; MacIntosh, Castandet, 2020). Нарешті, можливим місцем взаємодії РНКазы та віруса є ядро клітини, де ферментативна активність РНКазы може безпосередньо впливати на вірусну РНК і руйнувати її (Bald, 1964; Sugavara et al, 2016; Manjunatha et al, 2022)

Дослідження власне внутрішньоядерної локалізації деяких РНКаз триває, проте така локалізація вже була переконливо продемонстрована для бичачої РНКазы. Окрім того, пильна увага дослідників зосереджена на можливості втручання екзогенних РНКаз в процес РНК-інтерференції, що бере участь у захисті проти вірусів. Тому механізм противірусної активності РНКаз включає як прямий вплив на нуклеокапсид та нуклеїнову кислоту, так і непрямий вплив, тобто втручання в РНК-інтерференцію, індукцію апоптозу заражених клітин.

Трансгенні рослини з генами гетерологічних рибонуклеаз

В міру того, як розширювалось уявлення про роль РНКаз у захисті рослин від вірусних інфекцій, було започатковано новий напрямок створення стійких трансгенних рослин. Було

розпочато дослідження зі створення трансгенних ліній рослин з гетерологічними генами РНКаЗ, клонованими з організмів різного філогенетичного походження (табл. 3).

Вперше гени гетерологічної РНКази були перенесені в геном тютюну (*Nicotiana tabacum*). Було описано отримання трансгенних рослин тютюну, що експресують ген *rnc* бактеріального походження, що кодує ендорибонуклеазу РНКазу III, та мутантний ген *rnc70*, що кодує мутантну форму ферменту (Langenberg et al, 1997). РНКаза III дикого типу спричиняла незначну затримку росту в деяких рослинних лініях, але, незважаючи на це, трансгенні рослини як з білком дикого типу, так і мутантним, були стійкими до зараження РНК-вмісними вірусами із мультипартитним геномом, але не проти вірусів з одноланцюговим РНК-геномом (Langenberg et al, 1997). Використання гена *rnc70* дозволило також отримати трансгенну пшеницю, яка виявилася високостій-

кою до вірусу смугастої мозаїки ячменю (BSMV). У цих трансгенних рослинах були відсутні симптоми вірусної інфекції, а результати проведеного Вестерн-блотингу показали нижчий рівень акумуляції віріонів (Zhang et al, 2001). Більше того, подальші дослідження вказують на можливість використання такого типу підходу до захисту рослин впродовж декількох рослинних поколінь. Було встановлено, що ген *rnc70* в трансгенних лініях кукурудзи, вирощених в польових умовах конститутивно експресувався впродовж 12 поколінь. Виявилось, що після інфікування отриманих ліній вірусом RBSDV (збудником хвороби чорно-смугастої карликовості рису) розвиток симптомів був послаблений у порівнянні з рослинами дикого типу. Повторний молекулярно-біологічний аналіз щодо присутності гена *rnc70* довів, що трансген був стабільно інтегрований в геном і ефективно експресувався (Cao et al, 2013).

Таблиця 3. Перелік гетерологічних РНКаЗ, використаних для створення трансгенних рослин, стійких до широкого спектру вірусів

Гени, що кодують РНКази	Джерело гена	Трансгенні рослини, в яких еспресовано ген	Віруси, якими інфікували рослини	Посилання
<i>Rnc</i> , <i>rnc70</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Triticum aestivum</i> <i>Zea mays</i>	TEV, TMV BSMV RBSDV	Langenberg et al, 1997 Zhang et al, 2001 Cao et al, 2013
<i>RncIII</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	TMV	Zhirnov et al, 2016
<i>pac1</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> <i>Solanum tuberosum</i> <i>Impatiens walleriana</i> <i>Dendranthema grandiflora</i> , <i>Glicine mas</i>	CMV, PVY PSTVd TSWV CSVd, TSWV BCMV, BPMV, SMV, WMV SCSMV	Watanabe et al, 1995 Sano et al, 1997 Ogawa et al, 2005b Milosevic et al, 2013 Ogawa et al, 2005a Yang et al, 2019 Wang et al, 2022
<i>bov</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> <i>Solanum tuberosum</i>	TMV, CMV PVY	Trifonova et al, 2007 Sugawara, 2016 Potrokhov et al, 2021
<i>ZRNase II</i>	<i>Zinnia elegans</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Solanum tuberosum</i> <i>Petunia hybrida</i>	TMV PVY TMV	Trifonova et al, 2012 Potrokhov et al, 2021 Ovcharenko et al, 2023

Примітка. BCMV – Bean common mosaic virus, BPMV – Bean pod mottle virus, BSMV – Barley stripe mosaic virus, CSVd – Chrysanthemum stunt viroid, CMV – Cucumber mosaic virus, PSTVd – Potato spindle tuber viroid, PVY – Potato virus Y, RBSDV – Rice black-streaked dwarf virus, SCSMV – Sugarcane's streak mosaic virus, SMV – Soybean mosaic virus, TEV – Tobacco etch virus, TMV – Tobacco mosaic virus, TSWV – Tomato spotted wilt virus, WMV – Watermelon mosaic virus

Іншим прикладом використання бактеріальних нуклеаз, є використання високо активних нуклеаз отриманих з бактерій *Serratia marcescens*. Ці нуклеази неспецифічно розщеплюють як РНК, так і, навіть, деякі ДНК (Zhironov et al, 2016). При генетичній трансформації тютюну виявили, що РНКаза III з *S. marcescens* є токсичною для рослинних тканин при конститутивній експресії гена *RncIII*. Використання індукцибельного промотору гена аніонної пероксидази із *Solanum lycopersicum* (*TapI*) дозволило отримати трансгенні рослини тютюну. Активність цього промотора індукується пораненням. Проте, після інфікування вірусом тютюнової мозаїки (TMV) не спостерігали зменшення накопичення антигенів капсидного протеїна вірусу у трансформантів, порівняно з рослинами дикого типу. В той же час рівень експресії РНКаз у трансгенних рослинах через 84 год після поранення перевищував аналогічний показник у контрольних в 5–7 разів. Можна припустити, що експресія РНКазі III відбувалася занадто повільно і вірус встигав інфікувати клітину до моменту, коли ефективна робота РНКаз могла б перешкодити цьому.

Крім бактеріальних генів рибонуклеаз для створення стійких до вірусів трансгенних рослин використовували гени, клоновані з дріжджів. Ген дволанцюгової РНК-специфічної РНКазі *pac1* з *Schizosaccharomyces pombe* (Lino et al, 1991) був випробуваний як потенційний індуктор множинної стійкості до вірусів, оскільки як одноланцюгові, так і дволанцюгові РНК-віруси генерують реплікативну форму дволанцюгової РНК під час проходження циклу реплікації. Дволанцюгова РНК-специфічна рибонуклеаза (PAC1), кодована геном *Pac1*, може розпізнавати та деградувати дволанцюгову РНК. У трансгенних рослин з цим геном підтверджено мультівірусну стійкість. Було показано, що трансгенний тютюн був стійким до вірусу огіркової мозаїки (CMV) та вірусу Y картоплі (Watanabe et al, 1995). Рослини картоплі, в геном яких перенесли *pac1*, інгібували розвиток інфекції та накопичення віроїда при інокуляції віроїдом веретеноподібності бульб картоплі (PSTVd) (Ogawa et al, 2005b). Також були отримані трансгенні рослини хризантеми (*Dendranthema grandiflora*) з геном *pac1*. Після інокуляції віроїдом карликовості хри-

зантем, ці лінії виявилися стійкішими, ніж контрольні рослини, окрім того вони також виявилися менш чутливими до вірусу плямистого в'янення томата (TSWV) (Ogawa et al, 2005a). Трансгенна соя, що надекспресує ген РНКазі *pac1*, продемонструвала підвищену стійкість до множинних вірусів (Yang et al., 2019). З цим геном було також отримано трансгенні рослини цукрової тростини (*Saccharum officinarum*). Експресія PAC1 у трансгенній цукровій тростині була успішно продемонстрована та привела до створення вірусостійкої цукрової тростини. Трансгенні рослини заражали шляхом інокуляції SCSMV. Результати показали, що хоча всі трансгенні лінії були заражені SCSMV, мозаїчні симптоми, які з'явилися на листках, були значно м'якшими, ніж у дикого типу. Усі інфіковані трансгенні пагони переважали пагони дикого типу за інтенсивністю росту та показали значно нижче накопичення вірусних часток (Wang et al, 2022).

Однак, в дослідженнях використовували не лише гени клоновані з бактерій або дріжджів. Вивчали противірусний вплив тваринних рибонуклеаз при їх експресії у рослинах. Зокрема, ген *bov* з *Bos taurus*, що кодує рибонуклеазу А, який було перенесено в рослини шляхом генетичної трансформації. Структура та функціональний діапазон цього фермента досить досліджені. РНКаза підшлункової залози великої рогатої худоби розщеплює одноланцюгову РНК лише після свого дозрівання (видалення N-кінцевого лідерного пептиду під час секреції), тоді як незріла форма білка неактивна, і вона здійснює свою дію в лужному середовищі (Raines, 1998). Її використали для створення трансгенних рослин тютюну (*Nicotiana tabacum* cv. SR1). Рослини, які експресували позаклітинну рибонуклеазу з бичачої підшлункової залози, мали підвищений рівень активності рибонуклеази в екстрактах листя (Trifonova et al, 2007). Отримані рослини інфікували вірусом тютюнової мозаїки. Трансгенні рослини були значно більш захищеними від вірусної інфекції, ніж контрольні нетрансформовані рослини. Дослідники відзначали відсутність чи значну затримку прояву симптомів вірусної інфекції. Було зроблено припущення, що експресія гена цієї рибонуклеази може бути використана для ефективного захисту від вірусних захворювань

рослин (Trifonova et al, 2007). У іншій роботі трансгенний тютюн з геном рибонуклеази бика був перевірений на стійкість до вірусу огіркової мозаїки (CMV). В результаті через 10 днів після інокуляції спостерігали сильні симптоми мозаїки у контрольних нетрансгенних рослин, тоді як симптоми захворювання були менш яскраво виражені у трансгенних рослин, що експресували ген РНКази. Вирідно, що експресія РНКаз приводила до збільшення неспецифічної резистентності до РНК-геномних вірусів (Sugawara et al, 2016).

Переваги підходу продемонстровані не лише на прикладі трансгенних рослин модельного виду *Nicotiana tabacum*, що мали підвищену стійкість до рослинних вірусів (Sangaev et al, 2011; Sugawara et al, 2016). Ген рибонуклеази підшлункової залози бика (*bov*) використовували також для створення вірусостійких рослин картоплі — цінного сільськогосподарського виду. Зовнішній вигляд отриманих трансгенних рослин вигідно відрізнявся від контрольних після інфікування таких рослин У вірусом картоплі (PVY). Спостерігали сукупний вплив генотипу і активності РНКаз в рослинах на чутливість до вірусної інфекції. Проте у накопиченні вірусних антигенів не вдалося спостерігати достовірної різниці між трансгенними та контрольними рослинами (Potrokhov et al, 2021).

РНКаза А тваринного походження транспортується з цитоплазми в апопласт і не має очевидних функцій в рослинній клітині. Експресія цього РНК-гідролізуючого ферменту справляла позитивний вплив на стійкість рослин до вірусів з різних родин. Механізми дії цієї позаклітинної РНКази можуть полягати в безпосередньому гідролізі вірусної РНК у апопласті, перед проникненням в клітину, при проникненні в цитоплазму разом з вірусом, коли вірусна РНК звільняється від білків оболонки або в знищенні самої клітини шляхом гідролізу мРНК та рРНК, якщо вірус проникає в неї при механічному пошкодженні клітинної стінки. Позаклітинна РНКаза виявилася ефективною для боротьби з вірусами, які поширюються з клітини в клітину через плазмодесми та системно на значну відстань по флоемі рослин (Sugawara et al, 2016).

Розглядаючи варіанти використання генів РНКаз отриманих з різних видів, необхідно зазначити, що цікавим напрямком є використання власне рослинних РНКаз. Рибонуклеазу, ген якої починає експресуватися у відповідь на поранення, було виявлено в *Zinnia elegans* (Ye, Droste, 1996). Ген було клоновано (Ye, Droste, 1996; Sangaev, 2007) та підтверджено, що експресія гена *ZRNase II* була індукована у відповідь на поранення, оскільки мРНК цієї РНКази не була виявлена в непоранених органах циннії, а ген *ZRNase II* був індукований лише через 6 год після поранення. РНКаза циннії є позаклітинною — в клітині відбувається її транспорт у апопласт. Гіпотетичний механізм противірусної дії позаклітинної РНКази циннії може полягати, подібно до механізму дії РНКази А тваринного походження, як в ураженні геномної РНК вірусів на певних етапах їх проникнення в рослинну клітину, так і в моделюванні запрограмованої загибелі клітини. При порушенні цілісності тканин, вміст апопласту може проникати в цитоплазму пошкоджених клітин, у цьому випадку активні РНКази функціонують як білки-«кілери», які вбивають клітину та перешкоджають реплікації геномної РНК вірусу, що потрапив у неї, та подальшому системному ураженню рослини (Sangaev et al, 2011). Кількість досліджень, присвячених трансгенним рослинам із гетерологічними позаклітинними РНКазами, досить обмежена (Kochetov and Shumny, 2017). Руйнування РНК вірусу РНКазами затримує розвиток симптомів, пом'якшує їх вираженість або локалізує інфекцію (Trifonova et al, 2007). Такий підхід дає можливість отримувати як модельні, так і сільськогосподарські види рослин, стійкі до широкого спектру вірусів (Trifonova et al, 2012; Potrokhov et al, 2021; Ovcharenko et al, 2023).

Вперше ген *ZRNase II*, отриманий з *Zinnia elegans*, було використано для отримання трансгенних рослин тютюну з підвищеною рибонуклеазною активністю (Sangaev et al, 2007). Експресія гена *ZRNase II*, підвищувала рибонуклеазну активність трансгенних тютюнів у 10–15 разів в порівняно з контролем. Після інокуляції вірусом тютюнової мозаїки трансгенні рослини продемонстрували значну за-

тримку появи вірусних симптомів, які залежали від концентрації вірусу в інокулюмі та активності рибонуклеази (Trifonova et al, 2012).

У роботі Potrokhov et al (2021) також досліджували вплив експресії гена *ZRNase II* у трансгенній картоплі (*Solanum tuberosum*) на стійкість до Y вірусу картоплі (PVY). Виявили затримку розвитку симптомів інфекції та зменшення накопичення вірусних антигенів. Рівень активності РНКаз у трансгенних рослинах, що експресували ген *ZRNase II*, перевищував активність, виявлену в трансгенних рослинах картоплі з геном *bov*. Проте підвищена активність РНКаз не повністю запобігала розвитку вірусної інфекції у трансгенних рослинах. Візуальні прояви вірусної інфекції в трансгенній картоплі були менш вираженими, ніж у контрольних рослин, і їх розвиток затримувався, але повної ліквідації вірусу не відбулося. При порівнянні рівня накопичення вірусних антигенів у нетрансгенних контрольних рослинах картоплі та трансгенних рослинах з генами *bov* та *ZRNase II*, найнижчий рівень накопичення вірусу мали останні (Petrokhov et al, 2021).

Рослини петунії трансформовані геном *ZRNase II*, також мали підвищену активність РНКаз порівняно з контролем. Дослідження загальної антиоксидантної активності (АОА) листових екстрактів петунії показало, що після інфікування рослин вірусом тютюнової мозаїки, рівні АОА трансгенних рослин перевищували показники контрольних на 18–30 %, що може свідчити про їх підвищені життєздатність в умовах стресу та стійкість до вірусної інфекції (Petrokhov et al, 2022).

Trifonova et al (2012) спостерігали, що, у випадку низького (0,01 мкг/мл) або середнього (0,1 мкг/мл) вмісту вірусних частинок у інокуляті для інфікування рослин тютюну, накопичення вірусу та розвиток симптомів інфекції були відсутні або сповільнені у трансформованих рослинах порівняно з контрольними. Якщо концентрація TMV в інокуляті становила 10 мкг/мл, відмінності між інфікованим контролем і трансформованими рослинами через 3 тижні після інокуляції були менш очевидними. Отже, можна припустити, що існує певна залежність ефективності роботи екстракційних рибонуклеаз від інфікуючої

дозы. Проте, коли в подальшому для інфікування трансгенної петунії з геном *ZRNase II* було використано дуже високу інфікуючу дозу TMV (250 мкг/мл) для отримання можливої системної інфекції, спостерігали ефективний захист рослин, завдяки присутності та експресії гена *ZRNase II*. Непрямий імуноферментний аналіз показав, що інфіковані рослини, чутливого до цього вірусу сорту, накопчували у 3,3–4,0 рази менше вірусних антигенів порівняно з інфікованими рослинами дикого типу (Ovcharenko et al, 2023). Відмінності у симптомах вірусного ураження між рослинами дикого типу та трансгенними зберігалися і після 3 тижнів культивування. Ці результати демонструють розвиток інфекції з менш вираженими симптомами у інокульованих трансгенних рослин, що підтверджує результати попередніх робіт (Sangaev et al, 2007; Trifonova et al, 2012, Petrokhov et al, 2021).

Таким чином, результати аналізу стійкості до вірусів у трансгенних рослин з модифікованим рівнем РНКазної активності в апопласті дозволяють зробити висновок, що ці білки можуть сформувати «нуклеазний» бар'єр для РНК-вірусів, і розглянути їх як елементи неспецифічної системи захисту рослин. Підвищена стійкість трансгенних рослин, що експресують гетерологічні РНКазы, демонструє потребу більш детального вивчення ролі аутологічних та гетерологічних рибонуклеаз в захисній системі вищих рослин. На основі отриманих даних можна розробити стратегії отримання нових сортів сільськогосподарських рослин з підвищеним рівнем неспецифічної стійкості до вірусів, зокрема з генами позаклітинних РНКаз.

Узагальнення

В даній статті ми коротко охарактеризували основні способи протидії поширенню вірусних інфекцій. Зокрема, було акцентовано увагу на способах взаємодії рослини з вірусом. Було розглянуто перспективні методи генетичної інженерії, в результаті використання яких можна отримати рослини зі зміненим геномом, що, в свою чергу, дає змогу підвищити стійкість до фітовірусів. В сучасній практиці використовують декілька різних під-

ходів створення таких трансгенних рослин: це можуть бути як окремі гени вірусного походження, що кодують білки або геноми вірусів, так і гени, що кодують ферментативно активні білки, отримані з гетерологічних видів. Це можуть бути гени бактерій, грибів, тварин, рослин. Наразі не існує чіткої стратегії, яка б дозволила створювати абсолютно стійкі до вірусів рослини, оскільки між вірусом і рослиною іде постійне «змагання» в створенні механізмів ураження і захисту. Однак, пошуки нових та оптимізація наявних способів використання вже досліджених генів активно тривають, і в майбутньому неодмінно слід очікувати появи нових цікавих підходів до отримання стійких до вірусів рослин.

Конфлікт інтересів. У цій роботі конфлікт інтересів авторів відсутній.

Фінансування. Робота виконана за фінансової підтримки НАН України: проєкт № 0122U002115 «Механізми стресової адаптації та створення стійких ліній рослин методами генетичної інженерії» (шифр: III-5-22).

STRATEGIES FOR ENGINEERING OF VIRUS RESISTANT PLANTS: FOCUS ON RNAses

*A.O. Potrokhov, O.O. Ovcharenko **

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, 148, Zabolotnogo str., Kyiv, 03143, Ukraine

E-mail: ovcharenkooo77@gmail.com

Currently, there are about six and a half thousand species of viruses known in the world, among which more than one and a half thousand are phytoviruses. Most plant viruses are capable of causing epiphytotic, which lead to decreased yields, reduced product quality, and sometimes put valuable commercial varieties or even entire plant species at risk of extinction. The global spread of viruses leads to the need to strengthen phytosanitary and quarantine restrictions, which requires additional financial costs. Understanding of the viral biology and the principles of their propagation is a key factor in the formation of strategies and methods of combating these pathogens. Among the newest approaches are the genetic engineering technologies. Their use made it possible to create a number of plant varieties with increased resistance to viruses. However, the problem of creating virus-resistant plants still remains one of the most urgent, since with time viruses acquire the ability to bypass defense mechanisms and

there is a need to obtain new resistant varieties. There are several main approaches for obtaining of transgenic plants with increased resistance to viruses. They are based on: RNA interference, resistance associated with viral capsid proteins, RNA-satellites, antisense RNAs, replicases, RNA-dependent RNA polymerase, the action of ribonucleases, ribosome-inactivating proteins, hammerhead ribozymes, miRNAs, plant antibodies, etc. One of the approaches to creating of virus-resistant plants is the use of ribonucleases genes. The genes encoding ribonucleases have different natural origin and belong to a wide range of hosts: bacteria, fungi, plants, animals. In particular, extracellular ribonucleases are able to cut non-specifically molecules of viral RNA in apoplast, that allows to create plants with increased resistance to various phytoviruses. This review is focused on the study of various genetic engineering approaches and the prospects of their use for the creation of virus-resistant plants. Emphasis is placed on the study of heterologous ribonuclease genes influence.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Akbar S, Wei Y, Zhang M (2022) RNA Interference: promising approach to combat plant viruses. *Int J Mol Sci.* 23(10):5312 <https://doi.org/10.3390/ijms23105312>
- Akhter M, Nakahara KS, Masuta C (2021) Resistance induction based on the understanding of molecular interactions between plant viruses and host plants. 18: 176. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01647-4>
- Alam I, Sharmin, SA, Naher M et al (2013) Elimination and detection of viruses in meristem-derived plantlets of sweetpotato as a low-cost option toward commercialization. *3 Biotech.* 3(2):153–164. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0080-6>
- Ali S, Ganai B A, Kamili A N et al (2018) Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiol Res.* 212:29–37. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.008>
- Andersen EJ, Ali S, Byamukama E et al (2018) Disease resistance mechanisms in plants. *Genes (Basel)* 9(7): 339. <https://doi.org/10.3390/genes9070339>
- Ausubel FM (2005) Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol* 6:973–979. <https://doi.org/10.1038/ni1253>
- Bald JG (1964) Cytological evidence for the production of plant virus ribonucleic acid in the nucleus. *Virology* 22(3):377–387. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(64\)90028-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(64)90028-5)
- Balint-Kurti P (2019). The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Mol Plant Pathol* 20: 1163–1178. <https://doi.org/10.1111/mpp.12821>
- Bariola PA, MacIntosh GC, Green PJ (1999) Regulation of S-like ribonuclease levels in Arabidopsis. *Antisense*

- inhibition of RNS1 or RNS2 elevates anthocyanin accumulation. *Plant Physiol* 119(1):331–42. <https://doi.org/10.1104%2Fpp.119.1.331>
- Beachy RN (1997) Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Curr Opin Biotechnol* 8(2):215–220. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(97\)80105-XSi](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(97)80105-XSi)
- Bevan MW, Flavell RB, Chilton MD (1983) A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* 304(5922):184–187. Bibcode: 1983 Natur.304.184
- Bhattacharyya D, Gnanasekaran P, Kumar RK et al (2015) A geminivirus betasatellite damages the structural and functional integrity of chloroplasts leading to symptom formation and inhibition of photosynthesis. *J Exp Bot* 66 (19):5881–5895. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv299>
- Bradamante G, Mittelsten Scheid O, Incarbone M (2021) Under siege: virus control in plant meristems and progeny. *The Plant Cell* 33(8):2523–2537. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab140>
- Cao X, Lu Y, Di D et al (2013). Enhanced virus resistance in transgenic maize expressing a dsRNA-specific endoribonuclease gene from *E. coli*. *PLoS One* 8(10):1228–1232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060829>
- Citores L, Iglesias R, Ferreras JM (2021) Antiviral activity of ribosome-inactivating proteins. *Toxins*. 13 (2):80. <https://doi.org/10.3390/toxins13020080>
- Conti G, Rodriguez MC, Manacorda CA, Asurmendi S (2012) Transgenic expression of Tobacco mosaic virus capsid and movement proteins modulate plant basal defense and biotic stress responses in *Nicotiana tabacum*. *Mol Plant Microbe Interact* 25(10):1370–84. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-12-0075-R>
- Cosson P, Schurdi-Levraud V, Le QH et al (2012) The RTM resistance to potyviruses in *Arabidopsis thaliana*: natural variation of the RTM genes and evidence for the implication of additional genes. *PLoS One* 7(6): e39169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039169>
- Deshpande RA, Shankar V (2002) Ribonucleases from T2 family. *Crit Rev Microbiol* 28(2): 79–122. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046704>
- Ding LN, Li YT, Wu YZ et al (2022) Plant disease resistance-related signaling pathways: recent progress and future prospects. *Int J Mol Sci* 23(24): 16200. <https://doi.org/10.3390/ijms232416200>
- Dodds PN, Rathjen JP (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* 11: 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>
- Eleftherianos I, Tafesh-Edwards G, Mohamed A (2022) Pathogen infection routes and host innate immunity: lessons from insects. *Immunol Lett* 247: 46–51 <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2022.05.006>
- Flores R (2016) Highly abundant small interfering RNAs derived from a satellite RNA contribute to symptom attenuation by binding helper virus-encoded RNA silencing suppressors. *Front Plant Sci* 7: 692 <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00692>
- Gergerich RC, Dolja VV (2006) Introduction to plant viruses, the invisible foe. *Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2006-0414-01>
- Golemboski DB, Lomonosoff GP, Zaitlin M (1990) Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *Proc Natl Acad Sci* 87 (16):6311–6315. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.16.6311>
- Grech-Baran M, Witek K, Szajko K et al (2020) Extreme resistance to Potato virus Y in potato carrying the *Ry_{sto}* gene is mediated by a TIR-NLR immune receptor. *Plant Biotechnol J*. 18(3). <https://doi.org/10.1111/pbi.13230>
- Green PJ (1994) The ribonucleases of higher plants. *Ann Rev Plant Biol* 45(1): 421–445 <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.pp.45.060194.002225>
- Grout BWW (1999) Meristem-tip culture for propagation and virus elimination. In: Hall, R.D. (eds) *Plant Cell Culture Protocols. Methods In Molecular Biology™*, vol 111. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-583-9:115>
- Gupta N, Reddy K, Bhattacharyya D (2021) Plant responses to geminivirus infection: guardians of the plant immunity. *Virol J* 18(1):143. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01612-1>
- Hohn T, Richert-Pöggeler KR, Staginnus C et al (2008) Evolution of integrated plant viruses. *Plant Virus Evol* 53–81. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75763-4_4
- Hollings M (1965) Disease control through virus-free stock. *Ann Rev Phytopathol* 3(1):367–396. <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.py.03.090165.002055>
- Holmes FO (1938) Inheritance of resistance to tobacco-mosaic disease in tobacco. *Phytopathol* 28(8):553–561. <https://www.apsnet.org/edcenter/apsnetfeatures/Documents/2008/Holmes1938.pdf>
- Huttner E, Tucker W, Vermeulen A et al (2001) Ribozyme genes protecting transgenic melon plants against potyviruses. *Curr Issues Mol Biol* 3(2):27–34. <https://doi.org/10.21775/cimb.003.027>
- Jafarzade M, Ramezani M, Hedayati F et al (2019) Antibody-mediated resistance to rhizomania disease in sugar beet hairy roots. *Plant Pathol J* 35(6):692–697. <https://doi.org/10.5423/PJ.OA.04.2018.0073>
- Jewehan A, Salem N, Tyth Z et al (2022) Screening of

- Solanum (sections Lycopersicon and Juglandifolia) germplasm for reactions to the tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV). *J Plant Dis Prot* 129:117–123. <https://doi.org/10.1007/s41348-021-00535-x>
- Jiang T, Tao Z (2023) Unraveling the mechanisms of virus-induced symptom development in plants. *Plants* 12(15):2830. <https://doi.org/10.3390/plants12152830>
- Johnson AMA, Gopal DVRS, Sudhakar C (2020) GM Crops for plant virus resistance: a review. *Genet Modified Crops* 257–337. https://doi.org/10.1007/978-981-15-5932-7_11
- Kachroo P, Yoshioka K, Shah J et al (2000) Resistance to turnip crinkle virus in *Arabidopsis* is regulated by two host genes and is salicylic acid dependent but NPR1, ethylene, and jasmonate independent. *Plant Cell* 12:677–690. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.5.677>
- Kochetov A, Shumny V (2017) Transgenic plants as genetic models for studying functions of plant genes. *Russ J Genet: Appl Res* 7 (4):421–427. <https://doi.org/10.1134/S2079059717040050>
- Kumar P, Chandra S, Sangeeta Srivastava VC (2017) RGAs approach in identification of disease resistance genes and their deployment in crops improvement. https://www.ripublication.com/ijaar17/ijaarv12n2_08.pdf
- Kumar R, Kanwar SS (2020) Biotechnological production and applications of ribonucleases. 363–389. In Verma ML, Chandel AK (Eds.) (2020) Bio-technological production of bioactive compounds. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64323-0.00012-6>
- Kyrychenko AM, Kovalenko OG (2018) Basic engineering strategies for virus-resistant plants. *Cytol Genet* 52:213–21. <https://doi.org/10.3103/S0095452718030076>
- Lanfermeijer FC, Jiang G, Ferwerda MA et al (2004) The durable resistance gene Tm-2² from tomato confers resistance against ToMV in tobacco and preserves its viral specificity. *Plant Sci* 167(4):687–692. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.04.027>
- Langenberg W, Zhang L, Court D et al (1997) Transgenic tobacco plants expressing the bacterial mc gene resist virus infection. *Mol Breed* 3:391–399. <https://doi.org/10.1023/A:1009697507261>
- Lapidot M, Gafny R, Ding B, et al (1993) A dysfunctional movement protein of Tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. *Plant J* 4: 959–970. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-313X.1993.04060959.x>
- Lefeuvre P, Martin D, Elena SF et al (2019) Evolution and ecology of plant viruses. *Nat Rev Microbiol* 17:632–644. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0232-3>
- Li F, Wang A (2019) RNA-targeted antiviral immunity: more than just rna silencing. *Trends Microbiol* 27(9):792–805. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.05.007>
- Lindbo J, Falk W (2017) The impact of «coat protein-mediated virus resistance» in applied plant pathology and basic research. *Phytopathol* 107(6): 624–634. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-16-0442-RVW>
- Lino Y, Sugimoto A, Yamamoto M (1991) S.pombe *Pac1*, whose overexpression inhibits sexual development, encodes a ribonuclease III-like RNase. *EMBO* 10:221–226. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07939.x>
- Liu S, Chen M, Li R et al (2022) Identification of positive and negative regulators of antiviral RNA interference in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Communicat* 2994.13(1):2994 <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30771-0>
- MacIntosh GC, Castandet B (2020) Organellar and secretory ribonucleases: major players in plant RNA homeostasis. *Plant Physiol* 183(4):1438–1452. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00076>
- Mandadi KK, Scholthof KB (2013) Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? *Plant Cell* 5:1489–505. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.111658>
- Manjunatha L, Rajashekara H, Uppala LS et al (2022) Mechanisms of microbial plant protection and control of plant viruses. *Plants* 11(24):3449. <https://doi.org/10.3390/plants11243449>
- Marathe R, Anandalakshmi R, Liu Y, Dinesh-Kumar SP (2002) The tobacco mosaic virus resistance gene. *N Mol Plant Pathol* 3(3):167–172. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2002.00110.x>
- Mengist AA, Tenkegna TA (2021) The role of miRNA in plant-virus interaction: a review. *Mol Biol Rep* 48:2853–2861. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06290-4>
- Milosevic S, Simonovic A, Cingel A et al (2013) Introduction of dsRNA-specific ribonuclease pac1 into *Impatiens walleriana* provides resistance to Tomato spotted wilt virus. *Sci Hortic* 164(17):499–506. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.10.015>
- Monteiro F, and Nishimura MT (2018) Structural, functional, and genomic diversity of plant NLR proteins: an evolved resource for rational engineering of plant immunity. In *Ann Rev Phytopathol* 56, eds J.E. Leach and S.E. Lindow, (Palo Alto, CA: Annual Reviews) 243–267. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045817>
- Mushegian AR (2020) Are there 10³¹ virus particles on Earth, or more, or fewer? *J Bacteriol* 202 (9):10–1128. <https://doi.org/10.1128/jb.00052-20>
- Musidlak O, Nawrot R, Goździcka-Jyzefiak A (2017)

- Which plant proteins are involved in antiviral defense? Review on in vivo and in vitro activities of selected plant proteins against viruses. *Int J Mol Sci.* 18(11):2300. <https://doi.org/10.3390/ijms18112300>
- Nejdat A, Beachy RN (1989) Decreased levels of TMV coat protein in transgenic tobacco plants at elevated temperatures reduce resistance to TMV infection. *Virology* 73(2):531–538. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90565-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90565-5)
- Ogawa T, Toguri T, Kudoh H et al (2005a) Double-stranded RNA-specific ribonuclease confers tolerance against Chrysanthemum stunt viroid and Tomato spotted wilt virus in transgenic Chrysanthemum plants. *Breed Sci* 55(1):49–55. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.55.49>
- Ogawa T, Toguri T, Kudoh H et al (2005b) Transgenic potato expressing a double-stranded RNA-specific ribonucleases is resistant to Potato spindle tuber viroid. *Breed Sci* 15(12):1290–1294. <https://doi.org/10.1038/nbt1197-1290>
- Okada K, Kato T, Oikawa T et al (2020) A genetic analysis of the resistance in barley to soil-borne wheat mosaic virus. *Breed Sci* 70(5):617–622. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.20071>
- Ovcharenko O, Potrokhov A, Sosnovska D et al (2023) Increased virus resistance in transgenic petunia with heterologous ZRNase II gene. *JJBS* 16(4):587–592 <https://doi.org/10.54319/jjbs/160403>
- Ovcharenko OO, Rudas VA. (2023) Modern approaches to genetic engineering in the Orchidaceae family. *Cytol Genet* 57(2):142–156. <https://doi.org/10.3103/S0095452723020093>
- Park C-J, Kim K-J, Shin R et al (2003) Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *Plant J* 37(2):186–198. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01951.x>
- Parrella G, Ruffel S, Moretti A et al (2002) Recessive resistance genes against potyviruses are localized in colinear genomic regions of the tomato (*Lycopersicon spp.*) and pepper (*Capsicum spp.*) genomes. *Theor Appl Genet* 105:855–861. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1005-2>
- Perez K, Yeam I, Kang BC et al (2012) Tobacco etch virus infectivity in Capsicum spp. is determined by a maximum of three amino acids in the viral virulence determinant VPg. *Mol Plant Microbe Interact* 25(12):1562–1573. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-12-0091-R>
- Potrokhov A, Sosnovskaya D, Ovcharenko O (2022) Antioxidant activity of petunias with the heterologous ribonuclease ZRNase II gene infected with tobacco mosaic virus. *Innovat Biosyst Bioengineer* 6(1):40–45. <https://doi.org/10.20535/ibb.2022.6.1.254464>
- Potrokhov A, Sosnovska D, Ovcharenko O et al (2021) Increased ribonuclease activity in Solanum tuberosum L. transformed with heterologous genes of apoplastic ribonucleases as a putative approach for production of virus resistant plants. *Turk J Biol* 45(1):79–87. <https://doi.org/10.3906/biy-2007-87>
- Prasad A, Sett S, Prasad M (2022) Plant-virus-abiotic stress interactions: A complex interplay. *Environ Exp Bot* 199:104869. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.104869>
- Prins M, Laimer M, Noris E et al (2008) Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Mol Plant Pathol* 9:73–83. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00447.x>
- Pumplin N, Voinnet O (2013) RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat Rev Microbiol* 11(11):745–760. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3120>
- Raines R (1998) Ribonuclease A. *Chem Rev* 98 (3):1045–1066. <https://doi.org/10.1021/cr960427h>
- Rashid AHA, Lateef DD (2016) Novel techniques for gene delivery into plants and its applications for disease resistance in crops. *Am J Plant Sci* 7(1):181–193. <https://doi.org/10.4236/ajps.2016.71019>
- Richard MMS, Knip M, Aalders T et al (2020) Unlike many disease resistances, Rx1-mediated immunity to Potato virus X is not compromised at elevated temperatures. *Front Genet* 11:417. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00417>
- Rodríguez-Negrete EA, Carrillo-Tripp J, Rivera-Bustamante RF (2009) RNA silencing against geminivirus: complementary action of posttranscriptional gene silencing and transcriptional gene silencing in host recovery. *J Virol* 83(3):1332–1340. <https://doi.org/10.1128/JVI.01474-08>
- Ronde de D, Butterbach P, Kormelink R (2014) Dominant resistance against plant viruses. *Front Plant Sci* 5:307. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00307>
- Rubio M, Martínez-Gymez P, Dicenta F (2023) Apricot breeding for multiple resistance to Plum pox virus and Apple chlorotic leaf spot virus. *Sci Hort* 309:111706. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111706>
- Ruffel S, Dussault MH, Palloix A et al (2002) A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J* 32(6):1067–1075. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01499.x>
- Ruffel S, Gallois JL, Lesage ML, Caranta C (2005) The recessive potyvirus resistance gene pot-1 is the tomato orthologue of the pepper pvr2-eIF4E gene. *Mol Genet Genom* 274:346–353. <https://doi.org/10.1007/s00438-005-0003-x>
- Saez C, Flores-Leon A, Montero-Pau J et al (2022) RNA-Seq transcriptome analysis provides candidate

- genes for resistance to tomato leaf curl new Delhi virus in melon. *Front Plant Sci* 8(12):798858. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.798858>
- Safarnejad MR, Jouzani GS, Tabatabaie M et al (2011) Antibody-mediated resistance against plant pathogens. *Biotechnol Adv* 29:961–971. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.011>
- Salgotra RK, Stewart CN (2020) Functional markers for precision plant breeding. *Int J Mol Sci* 21(13):4792. <https://doi.org/10.3390/ijms21134792>
- Sangaev S, Kochetov A, Ibragimova SS et al (2011). Physiological role of extracellular ribonucleases of higher plants. *Russ J Genet: Appl Res* 1 (1):44–50. <https://doi.org/10.1134/S2079059711010060>
- Sangaev S, Trifonova E, Titov S et al (2007) Effective expression of the gene encoding an extracellular ribonuclease of *Zinnia elegans* in the SR1 *Nicotiana tabacum* plants. *Russ J Genet* 43 (7):831–833. <https://doi.org/10.1134/S1022795407070186>
- Sano T, Nagayama A, Ogawa T et al (1997) Transgenic potato expressing a double-stranded RNA-specific ribonucleases is resistant to potato spindle tuber viroid. *Nat Biotechnol* 15(12):1290–1294. <https://doi.org/10.1038/nbt1197-1290>
- Scaria V, Hariharan M, Maiti S et al (2006) Host-virus interaction: a new role for microRNAs. *Retrovirol* 3:68 <https://doi.org/10.1186/1742-4690-3-68>
- Sehrish A, Wei Y, Zhang M-Q (2022) RNA interference: promising approach to combat plant viruses. *Int J Mol Sci* 23(10):5312. <https://doi.org/10.3390/ijms23105312>
- Sekine K, Kawakami S, Hase S et al (2008) High level expression of a virus resistance gene, RCY1, confers extreme resistance to Cucumber mosaic virus in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* (11):1398–1407. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-11-1398>
- Seo YS, Rojas MR, Lee JY et al (2006) A viral resistance gene from common bean functions across plant families and is up-regulated in a non-virus-specific manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(32):11856–11861. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604815103>
- Shaikhaldein HO, Hoffmann B, Alaraidh IA et al (2018) Evaluation of extreme resistance genes of Potato virus X (Rx1 and Rx2) in different potato genotypes. *J Plant Dis Prot* 125:251–257. <https://doi.org/10.1007/s41348-018-0148-6>
- Sheat S, Winter S (2023) Developing broad-spectrum resistance in cassava against viruses causing the cassava mosaic and the cassava brown streak diseases. *Front Plant Sci* 14:1042701. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1042701>
- Shen W-X, Au P C K, Shi B-J et al (2015) Satellite RNAs interfere with the function of viral RNA silencing suppressors *Front Plant Sci* 6:281. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00281>
- Siar SV, Beligan GA, Sajise AJC et al (2011) Papaya ringspot virus resistance in *Carica papaya* via introgression from *Vasconcellea quercifolia*. *Euphyt* 181: 159–168. <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-011-0388-z>
- Sindarovska YR, Guzyk OI, Yuzvenko LV et al (2014) Ribonuclease activity of buckwheat plant (*Fagopyrum esculentum*) cultivars with different sensitivities to buckwheat burn virus *Ukr Biochem J* 86(3):33–40. <https://doi.org/10.15407/ubj86.03.033>
- Sindelarova M, Sindelar L (2018) Isolation of pathogenesis-related proteins from TMV-infected tobacco and their influence on infectivity of TMV. *Plant Protect Sci* 41(2):52–57. <https://doi.org/10.17221/2747-PPS>
- Singh A, Taneja J, Dasgupta I, Mukherjee SK (2015) Development of plants resistant to tomato geminiviruses using artificial trans-acting small interfering RNA. *Mol Plant Pathol* 16:724–734. <https://doi.org/10.1111/mpp.12229>
- Sugawara T, Trifonova E, Kochetov A, Kanayama Y (2016) Expression of an extracellular ribonuclease gene increases resistance to Cucumber mosaic virus in tobacco. *BMC Plant Biol* 16(3):246. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0928-8>
- Takken FLW, Albrecht M, Tameling WIL (2006) Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Curr Opin Plant Biol* 9:383–390. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.05.009>
- Taninaka Y, Nakahara KS, Hagiwara-Komoda Y (2020) Intracellular proliferation of clover yellow vein virus is unaffected by the recessive resistance gene *cyv1* of *Pisum sativum*. *Microbiol Immunol* 64(1):76–82. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12755>
- Tatineni S, Hein GL (2023) Plant viruses of agricultural importance: current and future perspectives of virus disease management strategies. *Phytopathol* 113(2): 117–141. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-22-0167-RVW>
- Teixeira RM, Ferreira MA, Raimundo GAS, Fontes EPB (2021) Geminiviral triggers and suppressors of plant antiviral immunity. *Microorg* 9(4):775. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040775>
- Trifonova E, Romanova A, Sangaev S et al (2012) Inducible expression of the gene of *Zinnia elegans* coding for extracellular ribonuclease in *Nicotiana tabacum* plants. *Biol Plantar* 56:571–574. <https://doi.org/10.1007/s10535-011-0206-4>
- Trifonova E, Sapotsky M, Komarova M et al (2007) Protection of transgenic tobacco plants expressing bovine pancreatic ribonuclease against tobacco mosaic virus. *Plant Cell Rep* 26(7):1121–1126. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0298-z>
- Varma A (1993) Integrated management of plant vi-

- ral diseases. Ciba Found Symp. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. 177:140–157. <https://doi.org/10.1002/9780470514474.ch9>
- Verchot J (2016) Plant Virus infection and the ubiquitin proteasome machinery: arms race along the endoplasmic reticulum. *Viruses* 8(11):314. <https://doi.org/10.3390/v8110314>
- Verma KK, Song XP, Budeguer F et al (2022). Genetic engineering: an efficient approach to mitigating biotic and abiotic stresses in sugarcane cultivation. *Plant Signal Behav* 17(1):2108253. <https://doi.org/10.1080/15592324.2022.2108253>
- Vicente M, De Fazio G, Menezes ME, Golgher RR (1987) Inhibition of plant viruses by human gamma interferon. *J Phytopathol* 119:25–31. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1987.tb04380.x>
- Wang MR, Hamborg Z, Blystad DR, Wang QC (2021) Combining thermotherapy with meristem culture for improved eradication of onion yellow dwarf virus and shallot latent virus from infected in vitro-cultured shallot shoots. *Ann Appl Biol* 178(3):442–449. <https://doi.org/10.1111/aab.12646>
- Wang W, Wang J, Feng X et al (2022). Breeding of virus-resistant transgenic sugarcane by the integration of the *Pac1* gene. *Front Sustain Food Syst* 6:925839. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.925839>
- Wang X, Kong L, Zhi P, Chang C (2020) Update on cuticular wax biosynthesis and its roles in plant disease resistance. *Int J Mol Sci* 21(15):5514. <https://doi.org/10.3390/ijms21155514>
- Watanabe T, Ogawa H, Takahashi I et al (1995) Resistance against multiple plant viruses in plants mediated by a double stranded-RNA specific ribonuclease. *FEBS Lett* 372(2–3):165–168. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00901-K](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00901-K)
- Xie Z, Fan B, Chen C, Chen Z (2001) An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98(11):6516–6521. <https://doi.org/10.1073/pnas.111440998>
- Yang X, Niu L, Zhang W et al. (2019). Increased multiple virus resistance in transgenic soybean over-expressing the double-strand RNA-specific ribonuclease gene *PAC1*. *Transgen Res* 28:129–140. <https://doi.org/10.1007/s11248-018-0108-8>
- Yang Z, Li Y (2018) Dissection of RNAi-based antiviral immunity in plants. *Curr Opin Virol* 32:88–99. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.08.003>
- Ye Z-H, Droste DL (1996) Isolation and characterization of cDNAs encoding xylogenesis-associated and wounding-induced ribonucleases in *Zinnia elegans*. *Plant Mol Biol* 30:697–709. <https://doi.org/10.1007/BF00019005>
- Younis A, Siddique MI, Kim CK, Lim KB (2014) RNA Interference (RNAi) induced gene silencing: a promising approach of Hi-tech plant breeding. *Int J Biol Sci* 10(10):1150–1158. <https://doi.org/10.7150/ijbs.10452>
- Zand Karimi H, Innes RW (2022) Molecular mechanisms underlying host-induced gene silencing. *Plant Cell* 34(9):3183–3199. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac165>
- Zhang L, French R, Langenberg W, Mitra A (2001) Accumulation of barley stripe mosaic virus is significantly reduced in transgenic wheat plants expressing a bacterial ribonuclease. *Transgen Res* 10(1):13–9. <https://doi.org/10.1023/a:1008931706679>
- Zhirnov IV, Trifonova EA, Romanova AV et al (2016) Induced expression of *Serratia marcescens* ribonuclease III gene in transgenic *Nicotiana tabacum* L. cv. SR1 tobacco plants. *Rus J Genet* 52 (11):1256–1261. <https://doi.org/10.1134/S102279541611017X>
- Zhu M, Jiang L, Bai B et al (2017) The intracellular immune receptor sw-5b confers broad-spectrum resistance to tospoviruses through recognition of a conserved 21-amino acid viral effector epitope. *Plant Cell* 29(9):2214–223. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00180>
- Zhu S, Jeong R-D, Lim G-H et al (2013) Double-stranded RNA-binding protein 4 is required for resistance signaling against viral and bacterial pathogens. *Cell Rep* 4(6):1168–1184. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.018>

Надійшла в редакцію 05.12.23
Після доопрацювання 19.12.23
Прийнята до друку 18.03.24