

УДК 578.85/.86:632.9

DOI 10.26897/978-5-9675-1762-4-2020-132

## ПРИМЕНЕНИЕ АНТИВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ дцРНК ДЛЯ ЗАЩИТЫ КАРТОФЕЛЯ

**Супрунова Татьяна Павловна**, к.б.н., старший научный сотрудник, ООО «МЛ «Резистом»

Email: [suprunova@gmail.com](mailto:suprunova@gmail.com)

**Маркин Николай Викторович**, к.б.н., научный сотрудник, ООО «МЛ «Резистом»

Email: [n.markin@dokagene.ru](mailto:n.markin@dokagene.ru)

**Игнатов Александр Николаевич**, д.б.н., старший научный сотрудник ООО «МЛ «Резистом»

Email: [an.ignatov@gmail.com](mailto:an.ignatov@gmail.com)

**Соловьев Андрей Геннадьевич**, д.б.н., заведующий лабораторией, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского – подразделение ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Email: [solovyev@belozersky.msu.ru](mailto:solovyev@belozersky.msu.ru)

**Калинина Наталья Олеговна**, д.б.н., Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского – подразделение ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Email: [nkalin46@mail.ru](mailto:nkalin46@mail.ru)

**Тальянский Михаил Эммануилович**, д.б.н., заведующий лабораторией, ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук»

Email: [Michael.Taliansky@hutton.ac.uk](mailto:Michael.Taliansky@hutton.ac.uk)

**Аннотация:** Одна из важнейших продовольственных культур в мире, картофель (*Solanum tuberosum* L.) заражается многими вирусами, из которых вирус Y (*Potatovirus Y*, PVY) имеет наиболее важное экономическое значение, вызывая существенные потери урожая. Испытано несколько альтернативных способов доставки дцРНК, из них наиболее перспективным оказался спрей-индуцированный сайленсинг генов (*spray-induced genesilencing* (SIGS)). Полученные результаты показали высокий эффект профилактического применения дцРНК. Обработка исходной рабочей концентрацией дцРНК защитила 100% и 65% растений от размножения вируса в течении 14 и 21 дня соответственно, и 65% растений были защищены минимальной испытанной концентрацией (10 нг/мл) в течении 14 дней. Терапевтическое применение дцРНК через 3 дня после инокуляции не оказало существенного воздействия на динамику накопления вируса в растении. Таким образом, в ходе проведенного эксперимента была продемонстрирована высокая биологическая

*антивирусная эффективность дцРНК при профилактической обработке растений картофеля на фоне искусственного заражения растений вирусом PVY.*

**Ключевые слова:** вирус картофеля Y, спрей-индуцированный сайленсинг генов, дцРНК

Одна из важнейших продовольственных культур в мире, картофель (*Solanum tuberosum*L.) заражается многими вирусами, из которых вирус Y (*Potatovirus Y*, PVY) имеет наиболее важное экономическое значение, вызывая существенные потери урожая [1]. Эффективных препаратов для защиты растений от вирусов практически не существует. Экзогенные двухцепочечные РНК (дцРНК), которые распространяются по растению локально и системно после процессинга в малые интерферирующие РНК, и индуцируют устойчивость растений к вирусам, опосредованную РНК-интерференцией, могут быть использованы в качестве биопестицидов [2]. Предложено несколько альтернативных способов доставки дцРНК, из них наиболее перспективным в настоящее время считается опрыскивание растений - спрей-индуцированный сайленсинг генов (spray-induced genesilencing (SIGS)). Экзогенные интерферирующие дцРНК могут доставляться в растительные клетки прямо через кутикулу, или через морфологические структуры листа - устьица, трихомы и другие [3]. В этой связи важно отметить, что локально нанесенные дцРНК также ингибируют вирулентность патогена в не обработанных листьях [1,3].

Частицы хитозана, функциолизованные дцРНК, были получены путем смешивания раствора хитозана, полученного растворением коммерческой формы хитозана в натрий-ацетатном буфере, с раствором триполифосфата. ДцРНК с целевым фрагментом генома PVY получена путем выделения ее из бактериальной культуры *E. coli* штамма HT115, куда она была трансформирована в виде плазмидной ДНК pL4440-PVY [4]. Рабочая концентрация дцРНК, определенная методом Nwokeojetal. [5], составляла примерно 200 нг/мкл. Растения сорта Лайонхарт (ООО «Дока-Генные Технологии», Московская обл.), выращиваемые при постоянной температуре 24°C и 16 ч освещении, были заражены изолятом вируса PVY-O (МГУ, Москва), и обработаны препаратом дцРНК (1,5 мл на растение).

Были использованы 2 варианта обработки – за 1 день до заражения вирусом и через 3 дня после заражения, и также различные концентрации препарата. Накопление вируса в растениях определяли методом ИФА с коммерческими антителами компании Biogeba (Швейцария) на 14 и 21 день после заражения.

Полученные результаты показали высокий эффект профилактического применения дцРНК. Обработка исходной рабочей концентрацией дцРНК защитила 100% и 65% растений от размножения вируса в течении 14 и 21 дня соответственно, и 65% растений были защищены минимальной испытанной концентрацией (10 нг/мкл) в течении 14 дней. Терапевтическое применение

дцРНК через 3 дня после инокуляции не оказало существенного воздействия на динамику накопления вируса в растении.

Таким образом, в ходе проведенного эксперимента, нами продемонстрирована высокая биологическая антивирусная эффективность дцРНК при профилактической обработке растений картофеля на фоне искусственного заражения растений вирусом PVY.

*Работа выполнена в рамках Проекта "МЛ "Резистом", который финансируется в соответствии с Соглашением о предоставлении гранта Фонда «Сколково» №Г18/19 от 26.04.2019 г.*

### **Библиографический список**

1. Макарова С.С., Макаров В.В., Тальянский М.Э., Калинина Н.О. Устойчивость картофеля к вирусам: современное состояние и перспективы. // Журнал генетики и селекции. 2017. Vol. 21, P. 62-73.
2. Морозов С.Ю., Соловьев А.Г., Калинина Н.О., Тальянский М.Э. Двуспиральные РНК как средство защиты растений от патогенных организмов и вирусов культивируемых растений. // ActaNaturae (русскаяязычная версия). 2019. Vol. 11, P.4-44.
3. Wang M., Yu F., Wu W., Zhang Y., Chang W., Ponnusamy M., Wang K., Li P. Circular RNAs: A novel type of non-coding RNA and their potential implications in antiviral immunity. // Int. J. Biol. Sci. 2017. V. 13. P. 1497–1506.
4. Posiri P., Ongvarrasopone C., Panyim S. A simple one-step method for producing dsRNA from E. coli to inhibit shrimp virus replication. //Journal of virological methods. 2013.Vol. 188, P. 64-69.
5. Nwokeoji A.O., Kilby P.M., Portwood D.E., Dickman M.J., 2017, Accurate Quantification of Nucleic Acids Using Hypochromicity Measurements in Conjunction with UV Spectrophotometry. //Anal. Chem. 2017. Vol. 89, P. 13567–13574.

### **Use of dsRNA-based antiviral compounds to protect potato plants**

***Suprunova, T.P., PhD in Biology***

***Markin N.V., PhD in Biology***

***Ignatov A.N., D.Sc. in Biology***

*LLC ML Resistom*

*143026, Moscow, SKOLKOVO Innovation Center Ter, Bolshoy b-R, 42/1*

***Solovyov A.G., D.Sc. in Biology***

***Kalinina N.O., D.Sc. in Biology***

*A. N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology – a subdivision of the Lomonosov Moscow State University*

*119992, Russia, Moscow, Leninskye gory, 1/40*

***Talyansky M.E., D.Sc. in Biology***

*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences, 117997, Russia, Moscow, GSP-7, Miklukho-Maklaya str., 16/10*

**Abstract:** *One of the most important food crops in the world, the potato (*Solanum tuberosum* L.) is infected with many viruses, of which the Y virus (Potato virus Y, PVY) is the most important economically, causing significant crop losses. Several alternative methods of dsRNA delivery have been tested, with the most promising being spray - induced gene silencing (SIGS). The results showed a high effect of preventive use of dsRNA. Treatment with the initial working concentration of dsRNA protected 100% and 65% of plants from virus propagation for 14 and 21 days, respectively, and 65% of plants were protected by the minimum tested concentration (10 ng/MCL) for 14 days. Therapeutic use of dsRNA 3 days after inoculation did not significantly affect the dynamics of virus accumulation in the plant. Thus, in the course of the experiment, a high biological antiviral effectiveness of dsRNA was demonstrated in the preventive treatment of potato plants against the background of artificial infection of plants with the PVY virus.*

**Keywords:** *potato virus Y, spray-induced gene silencing, dsRNA*