

А.М. КИРИЧЕНКО, Т.А. ТЕЛЕГЕСЬВА,
О.Г. КОВАЛЕНКО

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного
НАН України, Київ

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ СТІЙКОСТІ РОСЛИН ДО ВІРУСІВ



Аналізуються сучасні уявлення про молекулярно-генетичні механізми стійкості рослин до вірусів. Розглядаються дві стратегії антивірусного захисту рослин, обумовлені R-ген-опосередкованим механізмом і посттранскрипційним мовчанням генів (РНК-мовчання). Наведено приклади використання захисних механізмів для отримання сортів рослин, стійких до вірусів, за допомогою генно-інженерних технологій.

© А.М. КИРИЧЕНКО, Т.А. ТЕЛЕГЕСЬВА,
О.Г. КОВАЛЕНКО, 2007

Вступ. З часів виникнення людської цивілізації ураження культурних рослин різними патогенами мало значний вплив на їхню врожайність, а отже, і на благополуччя людей. Незважаючи на прогрес в усіх галузях науки і економіки, інфекційні хвороби рослин і тепер спричиняють великі збитки в рослинництві. Зростання чисельності населення на нашій планеті та прогресуюче зменшення земельних угідь, придатних для обробітку, змушують використовувати різні методичні підходи і заходи, спрямовані на збереження сільськогосподарської продукції. Одним із них є хімічний захист рослин від найбільш поширених захворювань. Використовуючи пестициди, вдається успішно контролювати розвиток багатьох інфекцій, що викликаються різноманітними патогенами, однак при цьому значно погіршується здоров'я людей і стан довкілля. Впровадження високоврожайних сортів забезпечує зростання продуктивності сільськогосподарських культур, але сприяє поширенню епіфітотій серед генетично споріднених видів рослин. Проте, цілком очевидно, що використовуючи власні захисні механізми рослин, можна досягти більш ефективного і екологічно безпечного захисту рослин від патогенів.

Загальні принципи класифікації захисних механізмів (механізмів стійкості) рослин ще остаточно не розроблені. Існують різні рівні і критерії у вирішенні проблеми класифікації явищ вірусостійкості. У відповідності з цим природну стійкість розглядають як активну та пасивну — за характером реакції рослин на вірус; загальну та специфічну — за спектром дії; вертикальну, горизонтальну, польову — за епідеміологічними характеристиками; моногенну, олігогенну, полігенну, домінуючу, рецесивну — за способом генетичної детермінації; імунітет, екстремальну стійкість, надчутливість, толерантність, стійкість до ураження, стійкість до поширення інфекції, стійкість до переносників вірусів тощо — за механізмами обмеження інфекції. Фенотиповим проявом природної стійкості може бути як повна відсутність зовнішніх ознак захворювання, так і поява мозаїки, жовтухи, сильного пригнічення росту чи навіть тотальна некротизація і відмирання рослин [2]. У випадку обмеження вірусної інфекції на тканинному рівні найбільш показовою є надчутлива реакція (НЧР) рослин-хазяїв, основними проявами якої є локалізація вірусної

інфекції у первинних ураженнях та зонах, що межують з ними, а також розвиток набутої стійкості до повторного ураження вірусом. Саме надчутливі рослини слугують досить зручною моделлю для вивчення механізмів вірусостійкості. Хоча у розумінні механізмів стійкості рослин вже є багато досягнень, молекулярно-генетичні процеси, завдяки яким рослині вдається протистояти патогенам, в повній мірі залишаються не з'ясованими. В даній роботі ми мали за мету проаналізувати генетичні детермінанти вірусостійкості та початкові етапи взаємодії патогена і рослини-хазяїна, акцентуючи увагу на стратегіях вірусного патогенезу та ключових моментах відповіді хазяїна, а також продемонструвати можливість практичного використання захисних механізмів в нетрадиційній селекції рослин.

Надчутлива реакція і R-ген-опосередковані захисні механізми

Надчутлива реакція (НЧР) — це захисна система, яка активізується в багатьох вищих рослин у відповідь на інфікування патогеном і характеризується швидкою некротизацією інфікованих клітин [3]. Некротизація рослинних клітин подібна до апоптозу (запрограмоване відмирання клітин) у тварин та комах і відіграє важливу роль в обмеженні патогенів у місцях їх проникнення [4—6]. Надчутлива реакція супроводжується рядом біохімічних, фізіологічних та молекулярних процесів, появою реактивного кисню (O_2 , H_2O_2 та OH^-), зростанням ліпоксигеназної активності, синтезом фітоалексинів, відкладанням лігніну та накопиченням патогенез-асоційованих білків [7]. НЧР збігається з пригніченням реплікації та поширенням вірусу, однак прямих доказів того, що вона безпосередньо інгібує ці процеси, немає. Молекулярні та біохімічні механізми, які відповідають за НЧР в рослинах, наразі достеменно невідомі. Слід зазначити, що стійкість не завжди пов'язана з надчутливою загибеллю рослинних клітин, і залишається незрозумілим, чи є НЧР запрограмованою і закономірною, чи вона є лише випадковим, побічним наслідком власних захисних реакцій [8, 9].

В детермінації вірусної патогенності визначна роль належить хазяйським факторам

[10]. Як правило, стійкість до вірусів контролюється одним геном [11]. Так, надчутливість до ВТМ у деяких сортів тютюну контролюється доміантним геном *N*, одержаним від дикого виду *Nicotiana glutinosa* в результаті міжвидової гібридизації [12]. Рослини тютюну з *N'*-геном, успадкованим від іншого дикого виду — *Nicotiana sylvestris*, здатні локалізувати лише штами ВТМ, що спричиняють некрози. Різновиди тютюну з рецесивними генами *n* чи *n'* на інокуляцію цим вірусом реагують системною інфекцією. В таких рослинах ВТМ зазвичай поширюється системно, викликаючи мозаїчні симптоми. Вважалось, що некротична реакція рослин з генами *N* або *N'* обумовлена подібними механізмами [13] і є результатом послідовних реакцій, які активуються продуктами вірусного геному чи чинниками, синтезованими в результаті вірусної репродукції. Пізніше було встановлено [14—16], що активація цих двох генних систем обумовлена різними механізмами за участю різних чинників: у рослин з *N'*-геном таким чинником є білок оболонки, тоді як для рослин з *N*-геном останній не є визначальним, і в індукції НЧР беруть участь інші чинники. В чутливих рослинах з *nn* генотипом білок оболонки ВТМ може викликати подібну до НЧР відповідь (утворення локальних некротів), однак рослини не стають стійкими до вірусної інфекції і вірус поширюється системно, викликаючи суворі некротичні ураження рослинної тканини [17].

Порівняльне вивчення інфекційного процесу у чутливих і надчутливих щодо ВТМ рослин показало, що вони мають захисний механізм, однаково ефективний щодо первинного інфікування патогеном, який виражається у зв'язуванні та інактивації вірусних часток на кутикулі і клітинних стінках [18]. Припускається, що в інактивації віріонів беруть участь речовини клітинних стінок, у тому числі протеїнази та РНКаз. В результаті дії механізму первинного захисту в клітині потрапляє близько 1 % вірусних частинок, які зв'язались з листками при механічній інокуляції. Однак у надчутливих рослин додатково діють і механізми обмеження інфекційного процесу, спрямовані на локалізацію вірусу (накопичення антивірусних речовин, некротизація інфікованих

клітин), і розвиток набутої стійкості до повторного ураження вірусом, тобто включаються різноманітні механізми активного захисту. В дослідях по перенесенню гена N за допомогою транспозонів кукурудзи *Ac* в клітини чутливого тютюну (*nn*) було встановлено, що цей ген є єдино необхідним і достатнім для розвитку НЧР до ВТМ [19].

Індукції НЧР передують специфічне впізнання вірусу, яке у більшості випадків базується на взаємодії продуктів домінуючих генів резистентності (R) рослин і відповідних генів авірулентності (Avr) вірусів [20]. Американським фітопатологом Флором ще в 1947 р. було запропоновано модель взаємодії в системі рослина—патоген, нині відому як теорія «ген-на-ген» [21]. За допомогою цієї моделі можна успішно описувати процеси взаємодії патогена і хазяїна в різних патосистемах. За останні 10 років було клоновано ряд генів стійкості рослин та виявлено продукти їх експресії. З іншого боку, у трьох головних групах патогенів (бактерії, гриби та віруси) були виділені та охарактеризовані відповідні гени авірулентності, що узгоджується з теорією «ген-на-ген» [22]. В деяких випадках продукти генів авірулентності могли діяти як еліситори, що є певними метаболітами фітопатогенів, дія яких на рослині призводить до включення захисних реакцій в рослинних тканинах. До еліситорів відносять також речовини, які утворюються у пошкоджених рослинних клітинах. Ці речовини діють подібно до гормонів, які поширюються по рослині, зв'язуються зі специфічними ре-

цепторами на клітинних мембранах та ініціюють каскад захисних механізмів [23]. При вірусних інфекціях функції еліситорів можуть виконувати ендogenous олігосахариди [24], глікопротеїни міжклітинного простору [25] та компоненти клітинних стінок рослин [26].

Незважаючи на широке коло патогенів (віруси, бактерії, гриби, нематоли, комахи), всі R-гени кодують незначну кількість типів білків із загальними консервативними ділянками. До таких структур належать сайт зв'язування нуклеотидів (nucleotide-binding site, NBS), область збагачених лейцином повторів (leucine-rich repeat, LRR), область з гомологією до цитоплазматичних доменів рецепторного білка Toll *Drosophila* та рецептора інтерлейкіна-1 ссавців (Toll/Interleukin-1 receptor, TIR), суперспіральна структура (coiled-coil structure, CC), трансмембранний домен (transmembrane domain, TM) та домен серин/треонін-специфічної протеїнкінази (serine/threonine protein kinase domain, PK) [8]. Порівняльний аналіз ряду R-генів свідчить про їх спільне походження від древньої родини генів і утворення шляхом дуплікацій, мутацій та рекомбінацій. Всі вони споріднені незалежно від того, проти якого типу патогена діють [27].

R-гени резистентності рослин зазвичай відносять до п'яти класів, сформованих за видом рослини-хазяїна та різновиду культури [28]. Найбільший клас R-генів кодує певний тип білка, який містить згадані нуклеотид-зв'язувальний сайт — NBS та лейцин-збагачувальний повтор — LRR (табл. 1).

Таблиця 1

Деякі групи домінуючих генів стійкості (R) проти вірусів та інших патогенів [28]

| R-гени | Рослини | Патогени | Типи білка |
|--------|-------------|-------------------------------|-------------|
| Prf | Томати | <i>Pseudomonas syringae</i> | LZ-NBS-LRR |
| Mi | Томати | <i>Meloidogine incognita</i> | LZ-NBS-LRR |
| Rx | Картопля | X-вірус картоплі | LZ-NBS-LRR |
| HRT | Арабідопсис | Вірус складчастості турнепса | LZ-NBS-LRR |
| Sw-5 | Томати | Вірус бронзовості томатів | LZ-NBS-LRR |
| l2c | Томати | <i>Fusarium oxysporum</i> | NBS-LRR |
| Bs2 | Перець | <i>Xanthomonas campestris</i> | NBS-LRR |
| Mla1 | Капуста | <i>Blumeria graminis</i> | CC-NBS-LRR |
| N | Тютюн | ВТМ | TIR-NBS-LRR |
| RPS4 | Арабідопсис | <i>P. syringae</i> | TIR-NBS-LRR |
| Cf9 | Томати | <i>Cladosporium fulvum</i> | LRR-TM |

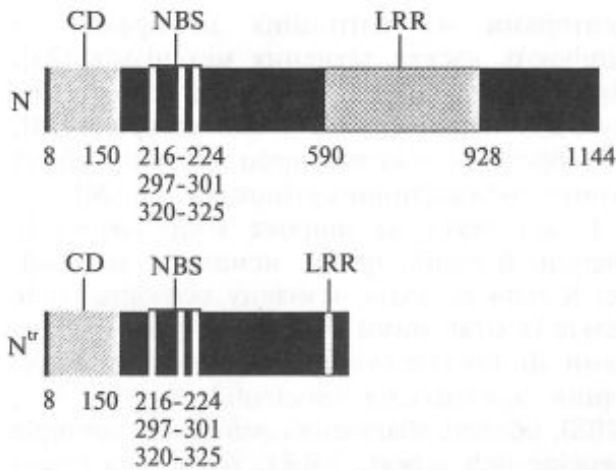


Рис. 1. Схематичне зображення білків N та Ntr. Показано три функціонально-активні домени: CD — цитоплазматичний домен, гомологічний цитоплазматичному домену Toll дрозоділи та інтерлейкіна-1 ссавців; NBS — нуклеотид-зв'язувальний сайт; LRR-лейцинзбагачена область. Ntr ідентичний N-білку, за виключенням 36 амінокислот, які відсутні в Ntr з боку карбоксильної групи [19]

Всі відомі на сьогодні R-гени вірусостійкості відносять до цього класу. Незважаючи на структурну подібність білків — продуктів генів вірусостійкості, всі вони функціонують проти вірусів, не споріднених між собою. Так, у *Arabidopsis thaliana* гени стійкості RCY1 та HRT кодують білки, подібні між собою на 91 %, але ефективні проти вірусів із різних таксономічних груп: вірусу огіркової мозаїки (*Cucumovirus*) та вірусу складчастості турнепса (*Carmovirus*) відповідно. Тому дослідникам необхідно враховувати, що R-білки, надзвичайно подібні за молекулярною будовою, можуть виконувати зовсім різні функції.

В межах великого класу NBS-LRR-вмісних генів стійкості на основі будови N-кінцевого домена можна виділити три підкласи білків: із спіралью закрученим доменом (CC-NBS-LRR), доменом із лейциновою застіркою (leucine zipper) (LZ-NBS-LRR) та TIR-доменом (TIR-NBS-LRR), гомологічним до N-кінцевого домену білка Toll дрозоділи та інтерлейкіна-1 ссавців.

N-ген надчутливості тютюну до ВТМ належить до підкласу TIR-NBS-LRR-генів. Продуктом цього гена є білок з молекулярною масою 132 кДа. Подібність N-кінцевого домену цього білка до цитоплазматичного домену

білка Toll дрозоділи (на 55 %) та рецептора інтерлейкіна-1 (на 49 %) ссавців дає підстави припустити, що білок молекулярною масою 132 кДа, подібно до двох інших, бере участь у передачі сигналу від N-гена до інших генів, які кодують синтез речовин, необхідних для розвитку стійкості рослин щодо ВТМ [19].

Структурно-функціональний аналіз білка — продукта гена стійкості показав, що сайт зв'язування нуклеотидів виявляється також у білках із кінцевою та АТФазною активністю. N-білок містить три ділянки, характерні для інших АТФ/ГТФ-зв'язувальних білків, тому доречно припустити, що цей білок теж може зв'язувати АТФ та ГТФ, значення яких все ще залишається незрозумілим, хоча відомо, що зв'язування ГТФ необхідне впродовж клітинного росту та диференціації [29]. АТФазну активність було встановлено для двох R-білків, але роль гідролізу АТФ у функціонуванні генів резистентності все ще невідома [30]. LRR було виявлено у білках, які беруть участь у сигнальній трансдукції, адгезії клітин, білок-білковому зв'язуванні чи білок-вуглеводній взаємодії [31, 32]. LRR-домен містить принаймні чотири неповні тандемні повтори. Ці повтори присутні в багатьох різноманітних класах білків і можуть бути як цитоплазматичними, так і позаклітинними. За допомогою мутаційного аналізу N-білка *Nicotiana glutinosa* було встановлено, що мутації в усіх трьох доменах знижують стійкість до ВТМ, що може свідчити про можливу роль кожного з них у розпізнаванні патогена і індукції стійкості [33].

Важливою особливістю експресії R-генів, які кодують білки з доменами TIR-NBS-LRR, є те, що деякі з них ініціюють утворення принаймні не одного транскрипту завдяки альтернативному сплайсингу. Так, N-ген тютюну започатковує два транскрипти — повної довжини (full-length (N)) та вкорочений (truncated (Ntr)) (рис. 1).

Існує думка, що альтернативний сплайсинг N-гена та відносна швидкість синтезу двох N-матриць регулюється ВТМ-індукованими сигналами [33]. Функції різних транскриптів та їх можливих продуктів залишаються невідомими, але вивчення молекулярних особливостей експресії N-гена тютюну показало, що сплайсинг і необхідне співвідношення транскриптів

впродовж всього патологічного процесу відіграють ключову роль у стійкості [8, 33].

Незважаючи на доступність клонованих генів резистентності та продуктів генів авірулентності патогенів, все ще залишається незрозумілим, яким чином відбувається процес їхнього взаємного розпізнавання. Спочатку було запропоновано рецептор-лігандну модель взаємодії, згідно з якою гени стійкості рослин кодують продукти, які функціонують як рецептори для впізнавання специфічних продуктів генів авірулентності та ініціації сигнальної трансдукції, що призводить врешті-решт до надчутливої відповіді та стійкості рослин [34]. Відомо, що будь-який вірусний білок може функціонувати як специфічна AVR детермінанта (табл. 2). Так, для індукції НЧР у тютюні NN-генотипу необхідна вірусна репліказа 126 кДа [35].

Процеси збудження рецептора та активації генів імунної відповіді опосередковані сигнальною трансдукцією, тобто передачею сигналу, в ході якої останній багаторазово підсилюється [36]. Цей процес здійснюється сигнальними системами, які беруть участь в регуляції різних сторін життєдіяльності організму. Схема, за допомогою якої можна пояснити рецептор-індукторну модель та яким чином продукти N-гена можуть брати участь в сигнальній трансдукції, зображена на рис. 2.

За цією моделлю N-білок, подібно до цитоплазматичного білка Toll дрозофіли та рецептора інтерлейкіна ссавців Іл-1, може функціонувати як рецептор, який безпосередньо взаємодіє з продуктами генів авірулентності ВТМ і запускає каскад захисних ре-

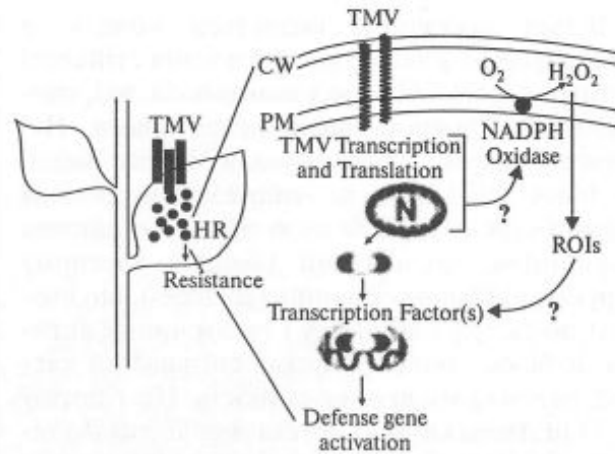


Рис. 2. Можлива модель сигнальної трансдукції, опосередкованої білком N: CW — клітинна стінка, PM — плазматична мембрана, ROIs — активні форми кисню [19]

акцій. Цьому передують проникнення вірусу в клітину та експресія вірусного геному [37]. Спочатку транслюється вірусна репліказа, необхідна для репродукції вірусу в цитоплазмі. Саме репліказа, на думку Whitham та ін. [19], необхідна для запуску НЧР, позаяк ні інтактні віріони, ні вірусний капсидний білок останню не викликають. В цитоплазмі N-білок може активувати фактор(и) транскрипції (transcription factor(s)), який індукуює експресію генів, необхідних для опосередкованої N-білком надчутливої відповіді.

За допомогою рецептор-лігандної моделі можна пояснити стійкість рослин до бактеріальної та грибною інфекції [38]. Однак роботи деяких авторів [28] свідчать про відсутність прямої взаємодії між продуктами генів R та Avr при інфікуванні рослин вірусами.

Таблиця 2

Клоновані гени стійкості та вірусні білки, які функціонують як AVR детермінанти [51]

| Гени стійкості | Рослини | Віруси | AVR детермінанти |
|----------------|--|---------------------------------|----------------------------|
| N | <i>Nicotiana sp.</i> | ВТМ | Репліказа |
| Rx1 | <i>Solanum tuberosum</i> | X-вірус картоплі | Білок оболонки |
| Rx2 | <i>S. tuberosum</i> | X-вірус картоплі | Білок оболонки |
| HRT | <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>ecotype Dijon-17</i> | Вірус складчатості турнепса | Білок оболонки |
| RCY1 | <i>A. thaliana ecotype C24</i> | Вірус огіркової мозаїки, штам Y | Білок оболонки |
| Sw-5 | <i>Lycopersicon sp.</i> | Вірус бронзовості томатів | РНК-залежна РНК полімераза |
| Y-1 | <i>S. tuberosum</i> | Y-вірус картоплі | Не відомо |
| Tm-2 | <i>Lycopersicon sp.</i> | Вірус мозаїки томатів | Транспортний білок |

Більш вірогідною видається модель, у відповідності з якою продукти генів стійкості активні в складі білкових комплексів, які, очевидно, і є повноцінними рецепторами. Цю гіпотезу вперше запропонували Van der Biezen та Jones [39] і назвали «гіпотезою охоронця» («guard hypothesis»). За цією гіпотезою патоген спричинює модифікації (змінює третинну структуру) білків-охоронців (guardees), що входять до складу комплексу і таким чином активує R-білок, який і запускає сигнальний каскад, результатом якого є стійкість. Цю гіпотезу було підтверджено в системі *Arabidopsis thaliana* — вірус складчастості турнепсу [40], а отримані нещодавно дані свідчать на користь існування R-білок вмісних комплексів [41—44]. За допомогою «гіпотези охоронця» можна пояснити, чому близькі за структурою R-білки виконують зовсім різні функції.

Таким чином, після розпізнавання патогена білок R прямо чи опосередковано запускає каскад(и) сигналів, які ініціюють захисні реакції рослин, в результаті чого в інфікованих та хворих клітинах і тканинах виникають і функціонують інші сигнальні системи.

Однією з таких систем є супероксидсинтазна сигнальна система рослин. Так, інфікування рослин і тварин часто супроводжується окиснювальним вибухом, який характеризується появою активних форм кисню (АФК) — перекису водню, гідроксид-радикала, аніон-радикала. АФК — це не лише високотоксичні сполуки, здатні локалізувати інфекцію, але й активні учасники сигнальної системи: супероксид-аніон та перекис водню активують транскрипцію і, як наслідок, експресію генів, що детермінують захист рослини. В цьому процесі важливу роль відіграє NADPH-оксидазна система цитоплазматичної мембрани, подібна до такої ж у макрофагів та нейтрофілів ссавців. В рослинах виявлено 113 генів, які можуть індукуватися АФК [45]. Однак залишається невідомим, у який спосіб здійснюється активація цих генів, хоча є дані, що АФК можуть виконувати роль поза- та внутрішньоклітинних месенджерів [7, 46].

За вірусної інфекції індукція АФК спостерігалась уже через декілька секунд після інокуляції як стійких, так і чутливих сортів тютюну, причому наявність інфекційного вірусу не

є обов'язковою: достатньо кілька окремих субодиниць білка оболонки, які здатні стимулювати NADPH-оксидазну активність за участю активних шляхів сигнальної трансдукції.

Джерелом АФК за вірусних інфекцій є внутрішньоклітинна флавінвмісна оксидаза — NADPH-оксидаза, причому важливе значення в утворенні її мають процеси фосфорилування і дефосфорилування [47]. Було встановлено [48], що швидка індукція АФК відбувається позаклітинно у більшості епідермальних клітин тютюну одразу ж після введення ВТМ. Це свідчить про те, що індукція АФК характерна для кожної клітини і не обмежується зоною локальних некрозів.

Індукція АФК відбувається у дві фази. Перша рання (позаклітинна) фаза є необхідною, але не вирішальною у формуванні стійкості до вірусу. Справжня стійкість пов'язана з другою, пізньою (клітинною) фазою і обумовлена генами стійкості, які активують клітинну сигнальну систему, тобто, окиснювальний вибух у другій фазі корелює з НЧР або загибеллю клітин [46]. Таким чином, швидкий окиснювальний вибух слугує прикладом механізму раннього розпізнавання вірусу клітиною і, вочевидь, є першим кроком в індукції стійкості [48]. На думку деяких авторів, АФК не беруть участі в індукції стійкості, хоча не виключене їхнє функціонування в процесі розвитку НЧР [49, 50].

Пост-транскрипційне мовчання генів як засіб детермінації вірусної стійкості

Існує понад 450 видів вірусів, здатних уражувати рослини та викликати різноманітні захворювання [51], однак рослини активно протидіють розвитку вірусних інфекцій завдяки сформованим та успадкованим в процесі еволюції захисним механізмам. Одним з таких механізмів є розглянута вище стійкість, опосередкована R-генами. Однак найбільш консервативним механізмом захисту клітинних РНК є РНК-мовчання, яке відіграє важливу роль в захисті евкаріотів від чужорідної інформації у вигляді нуклеїнових кислот вірусів, транспозонів, трансгенів тощо [51, 52]. РНК-мовчання властиве грибам («пригнічення»), тваринам (інтерферуючі РНК, іРНК) та рослинам (пост-транскрипційне мовчання

генів, ПТМГ) і має в цих системах подібні генетичні та біохімічні ознаки [53]. Вперше це явище було відкрите [54, 55] у трансгенних пелюстках, в які ввели копії гена *chalcon* синтетази. Виявилось, що інтродукція в геном трансформованої рослини декількох копій чужорідного гена викликає мовчання цих інтродукованих генів. Завдяки цьому відкриттю вчені змогли пояснити, чому трансгенні рослинні лінії, в яких накопичувалась незначна кількість трансгенної вірусної РНК, виявляються більш стійкими щодо вірусів, ніж лінії з високим рівнем накопичення останньої [56]. В стійких лініях рослин чужорідна РНК пошкоджувалась особливим, специфічним способом — ПТМГ. Загальною ключовою особливістю цього механізму є те, що він запускається дволанцюговою РНК (Δ РНК), яка під дією АТФ-залежної РНКазы III, названої Dicer, трансформується у короткі інтерферуючі РНК (κ РНК), довжиною 21—24 пар нуклеотидів. На наступному, АТФ-залежному етапі ці κ РНК приєднують полінуклеазний комплекс (RNA-induced silencing complex, RISC), в якому виконують роль «навідників» для послідовно-специфічного пошкодження РНК-мішені. Таким чином, послідовність РНК, гомологічна Δ РНК (тригеру замовчування), ушкоджується RISC, і ген, який кодує цю РНК, блокується, тобто ефективно «замовчується».

Окрім κ РНК, під дією Dicer утворюється інший клас невеликих РНК — мікроРНК ендогенного походження, які зазвичай беруть участь в процесах розвитку клітини, морфогенезу і координації між клітинною проліферацією та апоптозом [57]. МікроРНК входять до складу мікрорибонуклеопротеїнового комплексу [58] і можуть запускати сайт-специфічне розщеплення (ушкодження) мРНК-мішені після інкорпорації в функціональний RISC-комплекс. В такій ситуації мікроРНК можуть діяти, як κ РНК. Оскільки ці два класи РНК супроводжують ПТМГ, вони можуть слугувати маркером останнього [57].

Особливістю РНК-мовчання у рослин є те, що цей процес залучений до передачі сигналів між цитоплазмою та ядром [59]. Сигнали РНК-мовчання можуть також поширюватись між клітинами локально — через плазмодесми та системно — по судинній системі рослин [60].

ПТМГ обумовлює супресію чужорідних генетичних елементів, таких як віруси і транспозони, завдяки механізмам пошкодження специфічної РНК і виражається в пригніченні трансляції вірусної РНК та мРНК трансгена. Віруси можуть бути джерелом або мішенню РНК-мовчання. ПТМГ можуть викликати як РНК-віруси, які реплікуються в цитоплазмі, так і ДНК-віруси, які реплікуються в ядрі [61]. Як відомо [11], наявність темно-зелених ділянок листків, які чергуються з світло-зеленими ділянками, є загальною ознакою системного інфікування рослини «мозаїчним» вірусом. Клітини темно-зелених зон листка вільні від вірусу на відміну від інфікованих клітин із світло-зелених ділянок. Нещодавно було встановлено, що темно-зелені ділянки обумовлені дією механізму ПТМГ [62]. Явище перехресного захисту рослин можна пояснити наявністю ПТМГ, яке індукується слабким штамом вірусу і діє проти більш вірулентного спорідненого штаму [57]. Іншою формою вірус-індукованого РНК-мовчання є «одужання» рослин. Так, досить часто на вірус-інфікованих рослинах відростають нові безсимптомні листки. Пізніше було встановлено, що це явище обумовлене ПТМГ [51].

ПТМГ — це досить ефективна захисна система. Вона є специфічною щодо вірусу, який викликає її, але діє достатньо ефективно не проти одного, а багатьох вірусів. ПТМГ може проявлятися у прямому інгібуванні вірусного реплікативного циклу самим трансгеном або його РНК-транскриптом. У досліджах на рослинах було встановлено, що мовчання генів супроводжується накопиченням коротких РНК як у смисловій, так і антисмисловій орієнтації. Ці РНК можуть синтезуватись за допомогою РНК-залежної РНК-полімерази (РзРп) рослини-хазяїна [63]. Вважають [64], що цей фермент бере участь в РНК-мовчанні і відіграє важливу роль в антивірусному захисті. Трансгени з інвертованими повтори можуть безпосередньо синтезувати Δ РНК, без залучення РзРп. Стосовно РНК-геномних вірусів було встановлено, що Δ РНК утворюються як реплікативні інтермедіати (посередники) за допомогою РзРп рослини-хазяїна. Хоча віруси кодують «власну» РзРп, її участь в утворенні Δ РНК є маловірогідною [65, 66]. Δ РНК, синтезована будь-яким шляхом, слугує триге-

ром для синтезу компонентів, необхідних для послідовно-специфічного пошкодження трансгенної РНК.

Досить вагомим аргументом на користь ролі РНК-мовчання в антивірусному захисті є наявність супресорних білків — продуктів генів фітовірусів, які зі свого боку пригнічують це мовчання [67]. В табл. 3 представлені віруси, які синтезують такі супресорні білки. Одним із найбільш вивчених супресорів РНК-мовчання є продукт гена HCPro (helper component proteinase, HCPro) потівірусів. HCPro, пригнічуючи мовчання генів, не впливає на поширення сигналів мовчання, але попереджає розвиток реакції рослини на ці сигнали, тобто діє на стадію, яка передує накопиченню коротких РНК. Той факт, що фітовіруси кодують такі супресори, свідчить про те, що РНК-мовчання діє як природний захисний механізм, але не є засобом контролю за експресією генів хазяїна [68, 69]. Тобто, рослини адаптували ПТМГ для неспецифічного захисту від вірусних інфекцій, а фітовіруси у відповідь на це розвинули відповідні механізми, які пригнічують РНК-мовчання. В такий спосіб було еволюційно закріплено динамічну рівновагу між вірусами і їхніми хазяями як засіб співіснування екосистем.

Таким чином, ПТМГ має відношення до процесів пост-транскрипційного контролю експресії генів і функціонує як природна адаптивна захисна система рослин [70]. Деякі автори вважають, що ПТМГ є основою високорозвиненої імунної системи у вищих рослин [71].

Використання антивірусних механізмів рослин в генно-інженерних технологіях

Розвиток наших знань відносно молекулярної генетики фітовірусів і рослин в останні ро-

ки був досить успішним, що привело до появи нетрадиційних підходів до захисту рослин від вірусів. Так, за останні 15 років були розроблені нові «генно-інженерні» форми вірусної стійкості з використанням генів природної резистентності рослин та інтродукції в рослинний геном вірусних послідовностей (так звана патоген-обумовлена стійкість, ПОС). Найчастіше для ПОС використовують вірусні гени, що кодують білок оболонки, вірусну репліказу, транспортний білок, фактор перенесення вірусів комахами та послідовності, що контролюють реплікацію і експресію генів. Хоча дані підходи забезпечують очевидний успіх в обмеженні вірусних інфекцій в умовах теплиці чи в полі, наразі трансгенні культури рослин з функціональними генами або частиною геному рослинних вірусів не можуть бути впроваджені в рослинництво із міркувань біобезпеки [56].

Серед інших стратегій заслуговують на увагу підходи з використанням антивірусних білків *Phytolacca americana* (фітолаки), 2',5'-олігоаденілатсинтетази і так званих «рослинних анти-тіл» (plantibodies) [56].

Рослинні антитіла. На відміну від тварин, рослини не мають імунної системи, здатної продукувати антитіла, які можуть розпізнавати і інактивувати патогени, що проникають в організм. Однак завдяки досягненням генної інженерії і технологій отримання трансгенних рослин, в рослинний геном можна ввести гени, що кодують імуноглобуліни. Експресія цих генів призводить до утворення антитіл або їх фрагментів, здатних функціонувати в рослині. Цей підхід був використаний для отримання трансгенних рослин, стійких до вірусних інфекцій. Ще в 1993 р. було продемонстровано, що трансгенна експресія моновалентних (scFv) антитіл проти білка оболонки вірусу зморшку-

Таблиця 3

Віруси, які супресують мовчання генів [56]

| Вірус | Рід | Супресія | Білок |
|-------------------------------------|--------------------|-------------------|-------|
| Вірус мозаїки африканського маніока | <i>Begomovirus</i> | Повна | AC2 |
| Вірус огіркової мозаїки | <i>Cucumovirus</i> | Часткова/системна | 2b |
| X-вірус картоплі | <i>Potexvirus</i> | Часткова/системна | P25 |
| Y-вірус картоплі | <i>Potyvirus</i> | Повна | HCPro |
| Вірус білих листків рису | <i>Sobemovirus</i> | Повна | P1 |
| Вірус куцистої карликовасті томатів | <i>Tombusvirus</i> | Повна | NS3 |

ватої крапчатості артишока приводить до зниження сприйнятливості трансгенних рослин до цього вірусу [72]. Механізм, завдяки якому антитіла забезпечують стійкість, залишається не з'ясованим. Слабким моментом в «технології рослинних антитіл» є високий рівень генної експресії впродовж тривалого часу. Крім того, антитіла повинні пригнічувати вірусну інфекцію шляхом блокування міжклітинних процесів, необхідних для реплікації вірусів.

Антивірусні білки *Phytolacca americana*. Одним із підходів до створення вірусостійких рослин є використання специфічних природних інгібіторів вірусної реплікації. До найбільш перспективних для такого використання належать антивірусні білки фітолакки (АБФ), виділені із окремих її органів. АБФ — це 29 кД білки з активністю N-глікозидази, що інактивують рибосоми. Ці білки здатні вирізати аденін із *sar*сiп/*gic*сiп петлі рРНК великої субодиниці. Рибосоми з вилученими пуриновими основами нездатні зв'язувати фактор елонгації 2, в результаті чого відбувається пригнічення трансляції і клітина гине [73]. Завдяки цій властивості їх часто використовують в антивірусних цілях, хоча ці білки є потенційно токсичними і для рослин-хазяїв [74, 75]. Хоча антивірусна активність більшості білків, що інактивують рибосоми, пов'язана з токсичністю, роботи з мутантними АБФ, які експресувались в тютюні, свідчать про те, що ця активність може бути не пов'язаною з депуринізацією (вилученням пуринів) рибосом. Більше того, нещодавно було показано, що АБФ депуринізують РНК вірусів мозаїки костра та імунодефіциту людини *in vitro* і гальмують репродукцію цих вірусів *in vivo*, не вбиваючи при цьому хазяйські клітини [73]. Були виявлені або створені і менш токсичні та цілком нетоксичні форми АБФ, які мають здатність індукувати стійкість рослин до вірусів, не інактивуючи рибосоми [76, 77]. Цей напрямок може бути досить ефективним, оскільки експресія єдиного гена АБФ в трансгенних рослинах надає їм стійкості до широкого спектра фітовірусів, в той час як для захисту рослин від декількох вірусів за допомогою інших чинників необхідна експресія багатьох генів в одній трансгенній лінії.

2',5'-олігоаденілатсинтетаза. Протягом 90-х років досліджували можливість функціонування «тваринного» 2',5'-олігоаденілатного (2-5 А) шляху в рослинних тканинах, здатного забезпечувати у рослин вірусостійкість. Основними компонентами системи 2-5 А, яка у тварин відповідає за антивірусну активність, індуковану інтерфероном, є 2',5'-олігоаденілатсинтетаза та 2',5'-олігоаденілатзалежна рибонуклеаза (РНКазою L). Для формування стійкості необхідні обидва білки, однак донині залишається невідомим механізм їх антивірусної дії. Висловлювалось припущення [78], що в уражених клітинах під дією 2',5'-олігоаденілатсинтетази відбувається синтез Δ РНК, яка пошкоджується РНКазою L, і таким чином обмежується реплікація вірусів. Навіть дуже низького рівня експресії цих білків було достатньо для появи антивірусного ефекту. Експресія системи 2-5 А в рослинах має деякі переваги порівняно з іншими антивірусними стратегіями. Ця система забезпечує стійкість до будь-яких вірусів, здатних синтезувати Δ РНК в інфікованих клітинах. Більшість рослинних вірусів, включаючи економічно важливі потівіруси, є позитивними одноланцюговими РНК-вірусами, які впродовж реплікації утворюють Δ РНК-інтермедіати. Більше того, віруси рослин порівняно з вірусами вищих хребетних є більш вразливими щодо дії цієї системи. У створенні вірусостійкості шляхом трансформації рослин тваринною 2',5'-синтетазою було досягнуто певних успіхів [79, 80], але всупереч своєму значному потенціалу цей метод більше не розроблявся [56].

Незважаючи на існування великої кількості підходів при конструюванні вірусостійких рослин, використання таких технологій буде обмеженим у зв'язку з обережним відношенням населення до трансгенних продуктів харчування. За генно-інженерної селекції рослин необхідно враховувати можливу токсичність або алергічний вплив таких продуктів на людей та тварин при споживанні, а також вплив трансгенних рослин на навколишнє середовище. Адже залишаються зовсім не вивченими можливі наслідки еволюції патогенів на фоні їхньої взаємодії зі стійкими трансгенними рослинами [81]. Крім того, необхідно враховувати непередбачувану еволюцію даної флори

під впливом трансгенних форм. Відтак, ймовірно, в майбутньому при штучному трансгенозі переваги будуть надаватись таким подходам, як використання природних генів резистентності та розробка природного захисту на основі ПТМГ. З виділенням генів стійкості рослин відкриваються нові можливості конструювання генотипів, які можуть мати довготривалу стійкість до патогенів. Методи генетичної трансформації дозволять цілеспрямовано вводити детермінанти стійкості в нові сорти рослин, обминаючи довготривалі і не завжди ефективні етапи традиційної селекції, особливо у випадках міжвидової гібридизації [8]. Вже було перенесено клонований N-ген надчутливості з тютюну в рослини томатів [82]. N-ген обумовлював надчутливу відповідь, і трансформовані ним чутливі рослини ефективно локалізували ВТМ-інфекцію, як і в надчутливому тютюні. Поряд з практичним інтересом томати, які експресують функціональний N-ген, можуть бути зручною генетичною системою для вивчення шляхів сигнальної трансдукції, які ведуть до пригнічення реплікації вірусів та їх транспорту. Трансгенні рослини *Nicotiana benthamiana* з геном N також реагували на ВТМ надчутливою реакцією і обмежували системне поширення вірусу, локалізуючи інфекцію в місцях її проникнення. Тобто, N-ген може забезпечувати стійкість до ВТМ в гетерологічних системах, якими є томати та *N. benthamiana* [83]. Роботи по перенесенню ряду генів стійкості NBS/LRR класу в інші види продемонстрували їх важливе значення при створенні культурних рослин методами генетичної інженерії [82].

Однією з умов ПОС є високий рівень експресії вірусних генів, якою можна цілком знехтувати при трансгенній вірусостійкості, обумовленій «сумісною супресією» генів або ПТМГ. Хоча в трансгенних рослинах і відбувається накопичення чужорідної чи аберантної РНК, ПТМГ діє фактично як природна антивірусна захисна система [58]. Стійкість, обумовлена ПТМГ, задовольняє високі вимоги біобезпеки, позаяк в цьому процесі не відбувається трансгенного синтезу вірусних генів чи білків, а також відсутня трансгенна РНК, яка може вступати в РНК рекомбінацію. В майбутньому вченим належить ідентифікувати послідов-

ності РНК, які індукують РНК-мовчання вірусних генів. Ці послідовності матимуть важливе значення не лише для генетичної інженерії вірусостійких рослин, але й як знаряддя для аналізу функціонування молекулярно-генетичних механізмів [51].

РНК-мовчання та R-ген-опосередкована стійкість — це древні, консервативні та ефективні антивірусні захисні механізми, властиві рослинам [84, 85]. Ймовірно, у рослини також існують системи, які дозволяють цим механізмам взаємодіяти і в такий спосіб ефективно обмежувати розвиток вірусної інфекції. Наразі залишається нез'ясованим, яким чином відбувається така взаємодія, які сигнальні молекули можуть впливати на ці механізми і слугувати для зв'язку між ними, а також те, чи можуть вірусні супресори РНК-мовчання пригнічувати R-ген-опосередкований захист. Вирішення цих питань сприятиме кращому розумінню механізмів стійкості у рослин та цілеспрямованому використанню їх в генно-інженерних технологіях.

Таким чином, два шляхи — РНК-мовчання та R-ген-опосередкована стійкість — можуть переплітатися і забезпечувати ефективний захист рослин від різних патогенів, зокрема вірусів. Вивчення структурно-функціональних особливостей генів стійкості рослин, механізмів ліганд-рецепторної взаємодії між продуктами цих генів і генів авірулентності патогенів, генетичний аналіз R-ген-опосередкованої індукції НЧР та індукованої стійкості сприятиме створенню генно-інженерних сортів, стійких до широкого спектру патогенів. Генно-інженерна стійкість у рослин, зокрема РНК-опосередкована стійкість, набуває все більшого значення і, скоріш за все, буде відігравати ключову роль в рослинництві майбутнього.

SUMMARY. This paper gives a brief overview of the recent ideas about molecular and genetic mechanisms of plant resistance to viruses. Two plant antiviral strategies (R-gene-mediated mechanism and RNA-silencing) are considered. Examples of engineered virus resistance are presented.

РЕЗЮМЕ. Анализируются современные представления о молекулярно-генетических механизмах устойчивости растений к вирусам. Рассматриваются две стратегии антивирусной защиты, обусловленные R-

ген-опосередованим механізмом і посттранскрипційним молчанням генів (РНК-молчанням). Приведені приклади використання захисних механізмів для отримання сортів рослин, стійких до вірусів, з допомогою генно-інженерних технологій.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Щербатенко І.С. Стійкість рослин до вірусів // Мікробіол. журн. — 1996. — 58, № 2 — С. 81—100.
2. Коваленко А.Г. Белок-углеводное взаимодействие в реализации устойчивости растений к вирусам // Микробиол. журн. — 1993. — 55, № 6. — С. 74—91.
3. Pennazio S. The hypersensitive reaction of higher plants to viruses: a molecular approach // New Microbiol. — 1995. — 18, № 2. — P. 229—240.
4. Dangl J.L., Dietrich R.A., Richberg M.H. Death don't have no mercy: Cell death Programs in Plant-microbe interactions // Plant Cell. — 1996. — 10. — P. 1793—1807.
5. Greenberg J.T. Programmed cell death in plant-pathogen interactions // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol. — 1997. — 48. — P. 525—545.
6. Greenberg J.T., Guo A., Klessig D.F., Ausubel F.M. Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense function set // Cell. — 1994. — 77, № 4. — P. 551—563.
7. Mehdy M.C. Active oxygen species in plant defense against pathogens // Plant Physiol. — 1994. — 105. — P. 467—472.
8. Шамрай С.Н. Гены устойчивости растений: молекулярная и генетическая организация, функция и эволюция // Журн. общ. биологии. — 2003. — 64, № 3. — С. 195—214.
9. Jones D.A., Jones J.D.G. The roles of leucine-rich repeats in plant defenses // Adv. Bot. Res. Adv. Plant Pathol. — 1996. — 24. — P. 90—167.
10. Whitham S.A., Wang Y. Roles of host factors in plant viral pathogenicity // Curr. Opin. Plant Biol. — 2004. — 7, № 4. — P. 365—371.
11. Matthews R.E.F. Plant Virology. — New York; London: Acad. press, 1981. — 897 p.
12. Holmes F.O. Inheritance of resistance to tobacco mosaic virus disease in tobacco // Phytopathology. — 1938. — 28, № 7. — P. 553—561.
13. Sela I. Plant-virus interactions related to resistance and localization of viral infections // Adv. Virus Res. — 1981. — 26. — P. 201—237.
14. Saito T., Meshi T., Takamatsu N., Okada Y. Coat protein gene sequence of tobacco mosaic virus encodes a host response determinant // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1987. — 84. — P. 6074—6077.
15. Culver J.N., Dawson W.O. Tobacco mosaic virus elicitor protein genes produce a hypersensitive phenotype in transgenic *Nicotiana glauca* plants // Mol. Plant-Microbe Interact. — 1991. — 4. — P. 458—463.
16. Culver J.N., Stubbs G., Dawson W.O. Structure-function relationship between tobacco mosaic virus coat protein and hypersensitivity in *Nicotiana glauca* // J. Mol. Biol. — 1994. — 242, № 2. — P. 130—138.
17. Ehrenfeld N., Canon P., Stange C., Medina C., Arse-Johnson P. Tobamovirus coat protein CPCg induces an HR-like response in sensitive tobacco plants // Mol. Cells. — 2005. — 19, № 3. — P. 418—427.
18. Малиновский В.И., Журавлёв Ю.Н., Варфоломеева Л.А., Селецкая Л.Д. Агрегация и деградация вируса табачной мозаики в межклеточном пространстве листьев чувствительных и сверхчувствительных растений табака // Биол. науки. — 1990. — 4. — С. 26—31.
19. Whitham S., Dinesh-Kumar S.P., Choi D., Hehl R., Corr C., Baker B. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to Toll and the Interleukin-1 receptor // Cell. — 1994. — 78. — P. 1101—1115.
20. Keen N.T. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions // Annu. Rev. Genet. — 1990. — 24. — P. 447—463.
21. Flor H.H. Inheritance of reaction to rust in flax // J. Agr. Res. — 1947. — 74. — P. 241—262.
22. Keen N.T., Bent A., Staskawicz B. Plant disease genes: interactions with pathogens and their improved utilization to control plant diseases // Biotechnology in plant disease control. — 1993. — P. 65—88.
23. Ильинская Л.И., Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л. Биохимические аспекты индуцированной устойчивости и восприимчивости растений. — М.: ВИНТИ, 1991. — С. 1—102 (Итоги науки и техники. Сер. Защита растений, т. 7).
24. Fritig B., Kauffman S., Dumas B. et al. Mechanism of hypersensitivity reaction in plants // Plant Resistance to viruses. Giba Foundation Symposium, 133; Chichester, New York: Wiley, 1987. — P. 92—97.
25. Wieringa-Brants D.H., Dekker W.C. Induced resistance in hypersensitive tobacco against tobacco mosaic virus by injection of intercellular fluid from tobacco plants with systemic acquired resistance // Phytopathology. — 1987. — 118, № 2. — P. 165—170.
26. Modderman P.M., Schot C.P., Klis F.M., Wieringa-Brants D.N. Acquired resistance in hypersensitive tobacco against tobacco mosaic virus, induced by plant cell wall components // Phytopath. Z. — 1985. — 113, № 2. — P. 165—170.
27. Dinesh-Kumar SP, Wai-Hong T, Baker B.J. Structure-function analysis of tobacco mosaic virus resistance gene N // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2000. — 97. — P. 14789—14794.
28. Dangl J.L., Jones J.D.G. Plant pathogens and integrated defense responses to infection // Nature. — 2001. — 411. — P. 826—833.
29. Bourne H.R., Sanders D.A., McCormick F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions // Nature. — 1990. — 348. — P. 125—132.

30. Tameling W.I. The tomato R gene products I-2 and MI-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity // *Plant Cell*. — 2002. — **14**. — P. 2929–2939.
31. Jones D.A., Jones J.D.G. The roles of leucine-rich repeats in plant defenses // *Adv. Bot. Res. Adv. Plant Pathol.* — 1996. — **24**. — P. 90–167.
32. Kajava A.V. Structural diversity of leucine-rich repeat proteins // *J. Mol. Biol.* — 1998. — **277**. — P. 519–527.
33. Dinesh-Kumar S.P., Baker B. Alternatively spliced N resistance gene transcripts: their possible role in tobacco mosaic virus resistance // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 2000. — **97**. — P. 1908–1913.
34. Keen N.T. The molecular biology of disease resistance // *Plant Mol. Biol.* — 1992. — **19**. — P. 109–122.
35. Padgett H.S., Beachy R.N. Analysis of tobacco mosaic virus strain capable of overcoming N gene-mediated resistance // *Plant Cell*. — 1993. — **5**. — P. 577–586.
36. Lamb C.J. Plant disease resistance genes in signal perception and transduction // *Cell*. — 1994. — **76**. — P. 419–422.
37. Shaw J.G., Plaskitt K.A., Wilson T.M.A. Evidence that tobacco mosaic virus particles disassemble co-translationally in vivo // *Virology*. — 1986. — **148**. — P. 326–336.
38. Martin G.B., Bogdanove A.J., Sessa G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2003. — **54**. — P. 23–61.
39. Van der Biezen E.A., Jones J.D. Plant disease resistance proteins and the gene-for-gene concept // *Trends Biochem. Sci.* — 1998. — **23**. — P. 454–456.
40. Ren T., Qu F., Morris T.J. The nuclear localization of the *Arabidopsis* transcription factor TIP is blocked by its interaction with the coat protein of Turnip crinkle virus // *Virology*. — 2005. — **331**. — P. 316–324.
41. Lu R., Martin-Hernandez A.M., Peart J.R., Malcuit I., Baulcomb D.C. Virus-induced silencing in plants // *Methods*. — 2003. — **30**, № 4. — P. 296–303.
42. Hubert D.A. Cytosolic HSP90 associates with and modulates the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance protein // *EMBO J.* — 2003. — **22**. — P. 5679–5689.
43. Takahashi A., Casais C., Ichimura K., Shirasu K. HSP90 interacts with Rar1 and Sgt1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in *Arabidopsis* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 2003. — **100**. — P. 11777–11782.
44. Liu Y., Burch-Smith T., Schiff M., Feng S., Dinesh-Kumar S.P. Molecular chaperone Hsp90 associates with resistance protein N and its signaling proteins SGT1 and Rar1 to modulate an innate immune response in plants // *J. Biol. Chem.* — 2004. — **279**. — P. 2101–2108.
45. Vranova E., Inze D., Breusegem F. Signal transduction during oxidative stress // *J. Exp. Bot.* — 2002. — **53**, № 372. — P. 1227–1236.
46. Baker C.J., Orlandi E.W. Active oxygen in plant pathogenesis // *Annu. Rev. Phytopathol.* — 1995. — **33**. — P. 299–321.
47. Alan A.C., Fluhr R. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells // *Plant Cell*. — 1997. — **9**. — P. 15–59.
48. Andrew C., Allan A., Lapidot M., Culver J., Fluhr R. An early tobacco mosaic virus-induced oxidative burst in tobacco indicates extracellular perception of the virus coat protein // *Plant. Physiol.* — 2001. — **126**. — P. 97–108.
49. Ordog S.H., Higgins V.J., Vanlerberghe G.C. Mitochondrial alternative oxidase is not a critical component of plant viral resistance but may play a role in the hypersensitive response // *Plant Physiol.* — 2002. — **129**. — P. 1858–1865.
50. Gilliland A. Genetic modification of alternative respiration has differential effects on antimycin A-induced versus salicylic acid-induced resistance to Tobacco mosaic virus // *Plant Physiol.* — 2003. — **132**. — P. 1518–1528.
51. Soosaar J. Mechanisms of plant resistance to viruses // *Nat. Rev. Microbiol.* — 2005. — **10**. — P. 789–798.
52. Lu R. High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance // *EMBO J.* — 2003. — **22**. — P. 5690–5699.
53. Zamore P.D. Ancient pathways programmed by small RNAs // *Science*. — 2002. — **296**. — P. 1265–1269.
54. Van deer Karol A.R., Mur L.A., Beld M., Mol J.N.M., Stuitje A. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression // *Plant Cell*. — 1990. — **2**. — P. 291–299.
55. Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans // *Plant Cell*. — 1993. — **2**. — P. 279–289.
56. Goldbach R., Bucher E., Prins M. Resistance mechanisms to plant viruses: an overview // *Virus Res.* — 2003. — **92**. — P. 207–212.
57. Agrawal N., Dasaradhi P.V.N., Mohammed A., Malhotra P., Bhatnagar R.K., Mukherjee S.K. RNA Interference: biology, mechanism, and applications // *Microbiol. and Mol. Biol. Reviews*. — 2003. — **67**, № 4. — P. 657–685.
58. Hammond S.M., Berstein E., Beach D, Hannon G.J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells // *Nature*. — 2000. — **404**. — P. 293–296.
59. Aufsatz W., Mette M.F., van der Winden, Matzke A.J., Matzke M. RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis* // *Proc. Nat. Acad. Sci.* — 2002. — **8**. — P. 1–8.
60. Mlotshawa S., Voinnet O., Mette M. et al. RNA silencing and mobile silencing signal // *Plant Cell*. — 2002. — **14**. — P. 289–301.

61. English J., Mueller E., Baulcombe D. Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes // *Plant Cell*. — 1996. — 8. — P. 179—188.
62. Moore C.J., Sutherland P.W., Forster R.L., Gardner R.C., MacDiarmid R.M. Dark green islands in plant virus infection are the result of posttranscriptional gene silencing // *Mol. Plant Microbe Interact.* — 2001. — 14, № 8. — P. 939—946.
63. Wei T., Luo X.Y., Sanmuels V. Gene silencing: double-stranded RNA mediated mRNA degradation and gene inactivation // *Cell Res.* — 2001. — 11, № 3. — P. 181—186.
64. Ahlquist P. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing // *Science*. — 2002. — 296. — P. 1270—1273.
65. Klumpp K., Ruigrok R.W., Baudin F. Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure // *EMBO J.* — 1997. — 16. — P. 1248—1257.
66. Ahlquist P. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing // *Science*. — 2002. — 296. — P. 1270—1273.
67. Roth M.B., Pruss G.J., Vance V.B. Plant viral suppressors of RNA silencing // *Virus Res.* — 2004. — 110, № 1. — P. 97—108.
68. Voinnet O. RNA silencing as a plant immune system against viruses // *Trends Genet.* — 2001. — 17. — P. 449—459.
69. Baulcombe D. RNA silencing // *Curr. Biol.* — 2002. — 12, № 3. — P. 82—84.
70. Vance V., Vaucheret H. RNA silencing in plants—defense and counter defense // *Science*. — 2001. — 292. — P. 2277—2280.
71. Likelier C., Ovine O. RNA silencing: no mercy for viruses? // *Immunological reviews*. — 2004. — 198, № 1. — P. 285—303.
72. Tavliadoraki P., Benvenuto E., Trinca S., De Martinis D., Cattaneo A., Galeffi P. Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack // *Nature*. — 1993. — 366. — P. 469—472.
73. Wang P.G., Hudak A.K. A novel interaction of pokeweed antiviral protein with translation initiation factors 4G and iso4G: a potential indirect mechanism to access viral RNAs // *Nucl. Acids Res.* — 2006. — 34, № 4. — P. 1174—1181.
74. Wang P.G., Tumer N.E. Virus resistance mediated by ribosome inactivating proteins // *Adv. Virus Res.* — 2000. — 55. — P. 325—355.
75. Nielsen K., Boston R.S. Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective // *Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* — 2001. — 52. — P. 785—816.
76. Wang P.G., Zoubenko O., Tumer N.E. Reduced toxicity and broad spectrum resistance to viral and fungal infection in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein II // *Plant Mol. Biol.* — 1998. — 38, № 6. — P. 957—964.
77. Zoubenko O., Hudak K., Tumer N.E. A non-toxic pokeweed antiviral protein mutant inhibits pathogen infection via a novel salicylic acid-independent pathway // *Plant Mol. Biol.* — 2000. — 44. — P. 219—229.
78. Mitra A., Higgins D.W., Langerberg W.G., Nie H., Sengupta D.N., Silverman R.H. A mammalian 2-5A system functions as an antiviral pathway in transgenic plants // *Proc. Nat. Acad. Sci.* — 1996. — 93. — P. 6780—6785.
79. Truve E., Aaspollu A., Honkanen J., Puska R., Mehto M., Hassi A., Terri T.N., Kelve M., Seppanen P., Saarma M. Transgenic potato plants expressing mammalian 2,5-oligoadenylate synthetase are protected from potato virus-X infection under field conditions // *Biotechnology*. — 1993. — 11, № 9. — P. 1048—1052.
80. Truve E., Kelve M., Aaspollu A., Kuuskalu A., Seppanen P., Saarma M. Principles and background for the construction of transgenic plants displaying multiple virus-resistance // *Arch. Virol. Suppl.* — 1994. — 9. — P. 41—50.
81. Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Джавахия В.Г., Багирова С.Ф. Общая и молекулярная фитопатология. — М., 2001. — 302 с.
82. Whitham S., McCormick S., Baker B. The N gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1996. — 93. — P. 8776—8771.
83. Liu Y., Schiff M., Marathe R., Dinesh-Kumar S.P. Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus // *Plant J.* — 2002. — 30, № 4. — P. 415—417.
84. Ritzenthaler C. Resistance to plant viruses: old issue, news answers? // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2005. — 2. — P. 118—122.
85. Dunoyer P., Voinnet O. The complex interplay between plant viruses and host RNA-silencing pathways // *Curr. Opin. Plant Biol.* — 2005. — 4. — P. 415—423.

Надійшла 27.01.06