

УДК 575.26:575.21:575.22

UDC 575.26:575.21:575.22

06.01.05 - Селекция и семеноводство
сельскохозяйственных растений
(сельскохозяйственные науки)

06.01.05 - Selection and seed production of
agricultural plants (agricultural sciences)

**РНК-СОДЕРЖАЩИЙ ВИРУС
ШТРИХОВАТОЙ МОЗАИКИ ЯЧМЕНЯ КАК
МУТАГЕННЫЙ АГЕНТ**

**RNA-CONTAINING BARLEY STRIPE MOSAIC
VIRUS AS A MUTAGENIC AGENT**

¹Плотников Владимир Константинович
д.б.н., доцент
SPIN-код: 3971-2200
ID: 3971-2200
vkpbio21@mail.ru

¹Plotnikov Vladimir Konstantinovich
Dr.Sci.Biol., Associate Professor
RSCI SPIN-code: 3971-2200
ID: 3971-2200
vkpbio21@mail.ru

²Насонов Андрей Иванович
к.б.н.
SPIN-код: 5636-6106
Scopus ID: 56989221000,
Researcher ID: K-9142-2017
nasoan@mail.ru

²Nasonov Andrey Ivanovich
Cand.Biol.Sci.
RSCI SPIN-code: 5636-6106
Scopus ID: 56989221000,
Researcher ID: K-9142-2017
nasoan@mail.ru

¹Салфетников Анатолий Алексеевич
д.с.-х.н., профессор
SPIN-код: 9655-3687
ID: 9677-3687
Salfetnikov39@mail.ru

¹Salfetnikov Anatoliy Alexeevich
Dr.Sci.Agr., Professor
RSCI SPIN-code: 9655-3687
ID: 428377
Salfetnikov39@mail.ru

¹К «Кубанский государственный аграрный
университет им И.Т. Трубилина»,
Краснодар, Россия

¹ *Kuban State Agrarian University named after
I.T.Trubilin, Krasnodar, Russia*

²Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Северо-Кавказский
Федеральный научный центр садоводства,
виноградарства, виноделия», Краснодар, Россия

² *Federal State Budgetary Scientific Institution «North
Caucasian Federal scientific center for horticulture,
viticulture, winemaking», Krasnodar, Russia*

В обзорной статье рассматривается краткая история и содержание вирусологии. Пандемия корона-вируса 2020 года совпала со 100-летием смерти Дмитрия Иосифовича Ивановского (1864-1920), открывшего первый вирус – вирус томатной мозаики (ВТМ) и таким образом, основавшим новую отрасль науки – вирусологию. Особое внимание уделяется РНК-содержащему вирусу штриховатой мозаики ячменя (ВШМЯ), обладающему уникальными свойствами проникать в апикальную меристему растений (ячмень, овёс, пшеница и кукуруза) и локализоваться в генеративных органах и в зерне. Это определяет высокую мутагенную активность ВШМЯ, которую возможно использовать на практике для получения исходного материала в селекции сельскохозяйственных культур. Представлены результаты исследований усиления мутагенной активности ВШМЯ на ячмене в присутствии экзогенных нуклеиновых кислот овса, а также характеристики Северо-Кавказского штамма ВШМЯ, выделенного из листьев ячменя, электронной микроскопией, электрофорезом и

The review article discusses the brief history and content of Virology. The corona virus pandemic of 2020 coincided with the 100th anniversary of the death of Dmitry Iosifovich Ivanovsky (1864-1920), who discovered the first virus – the tomato mosaic virus (TMV) and thus founded a new branch of science – Virology. Special attention is paid to the RNA-containing Barley stripe mosaic virus (BSMV), which has unique properties to penetrate the apical meristem of plants (barley, oats, wheat and corn) and localize in the generative organs and in the grain. This determines the high mutagenic activity of BSMV, which can be used in practice to obtain the source material in the selection of agricultural crops. The results of studies enhance mutagenic activity BSMV on barley in the presence of exogenous nucleic acids of oats, and characteristics of the North-Caucasian BSMV strain isolated from barley leaves, electron microscopy, electrophoresis and ion-exchange chromatography RNA. Genetic engineering methods have shown that the mutagenic activity of BSMV is determined by its ability to enhance the movement of migrating genetic elements through the genome and cause the silence of

ионообменной хроматографией РНК вируса. Методами генной инженерии показано, что мутагенная активность ВШМЯ определяется его способностью усиливать передвижение по геному мигрирующих генетических элементов и вызывать посттранскрипционное молчание многих белоксинтезирующих генов

many protein-synthesizing genes

Ключевые слова: ВИРУСОЛОГИЯ, ЯЧМЕНЬ, ВШМЯ, МУТАГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ, СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ШТАММ, ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ, ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ, ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Keywords: VIROLOGY, BARLEY, BSMV, MUTAGENIC ACTIVITY, NORTH CAUCASIAN STRAIN, ELECTRON MICROSCOPY, ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY, GENETIC ENGINEERING RESEARCH

DOI: <http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-161-016>

Введение

РНК-содержащие вирусы доставляют наибольшие проблемы для человечества. Это вирусы гриппа, иммунодефицита (СПИД) и, наконец, корона-вирус. РНК – удивительное вещество, поражающее разнообразием своих типов и функций, красотой и согласованностью клеточных процессов, в которых оно принимает участие. РНК обладает рибозимными свойствами, т.е. она способна катализировать биохимические реакции подобно белкам-ферментам. Но самое главное – различные виды РНК (мРНК, рРНК и тРНК) составляют структурные и функциональные компоненты белоксинтезирующей системы живой клетки, которая и является основной целью «молекулярного паразитирования» вирусов.

Однако некоторые РНК-содержащие вирусы интересны человеку, когда их функционирование приводит к полезным практическим приложениям. Одним из таковых является вирус штриховатой мозаики ячменя (ВШМЯ), обладающий уникальными особенностями, позволяющими ему вызывать мутации многих генов через усиление активности передвижения мигрирующих генетических элементов (например, в геноме человека они составляют 40 %) и одновременно вызывать сайленсиг (посттранскрипционное молчание) многих белоксинтезирующих генов (например, в геноме человека они составляют 1,6 %) [11, 12, 20, 21].

Зарождение вирусологии связано с вирусом растений, а конкретно – с открытием РНК-содержащего вируса табачной мозаики (ВТМ). Вирусология – одна из самых стремительно развивающихся областей биологии. Это объясняется тем, что вирусы позволили обнаружить новые, неизвестные ранее формы нуклеиновых кислот, в составе некоторых из них – необычные органические основания. Они сыграли выдающуюся роль в доказательстве генетических функций нуклеиновых кислот, расшифровке генетического кода, понимании важнейших механизмов регуляции синтеза клеточных макромолекул и позволили обнаружить новые способы передачи генетической информации от клетки к клетке.

В связи с пандемией вирусного происхождения, вирусы стали главной темой 2020 года. Но полезно вспомнить, что вирусы открыты были в России, в Санкт-Петербургском университете. И первым вирусом, попавшим в поле зрения человека, стал РНК-содержащий вирус табачной мозаики (ВТМ). Вирусология как самостоятельная отрасль науки ведёт свой отсчёт с февраля 1892 года, когда 27-летний Дмитрий Иосифович Ивановский (1864–1920) опубликовал статью «О двух болезнях табака» в журнале «Сельское хозяйство и лесоводство». Краткая её версия на немецком языке появилась в «Трудах Императорской Академии Санкт-Петербурга». Отчёт о своих пятилетних экспериментах молодой человек представил на заседании Академии наук 12 февраля 1892 года. Так виновник неурожайности табака стал популярным объектом исследователей.

Таким образом, пандемия корона-вируса совпала со 100-летием смерти Д. И. Ивановского, который установил, что некий патоген проходит сквозь мельчайшие поры фарфорового фильтра, разработанного в 1884 году сотрудником Луи Пастера Шарлем Шамберланом и считавшегося надёжной преградой для бактерий. И фильтрат сока листьев сохранял свою заразность.

В 1939 году ВТМ впервые увидели в электронный микроскоп. Строение вируса было разгадано в 1955 году с помощью кристаллографии одним из самых талантливых кристаллографов XX века Розалиндой Франклин (Великобритания). Той самой, благодаря данным которой Уотсон и Крик смогли понять структуру ДНК. Она предсказала внутреннюю пустоту вируса и поняла, что его РНК была одноцепочечной. В это же время Ханс Френкель-Конрад и Робли Уильямс из университета Беркли (США) показали, что в вирусе нет ничего, кроме белка и РНК.

В 1946 году Нобелевская премия присуждена американскому исследователю Уэнделу Стэнли за работы по химическому составу вирусов. Он сумел изолировать кристаллы вируса табачной мозаики из заражённых листьев, получивших название «кристаллы Ивановского», и доказать их корпускулярные свойства. В своих статьях и нобелевской лекции лауреат отметил приоритет исследований русского учёного и оценил их роль в зарождении новой науки о фильтрующихся вирусах (к середине XX века уже были известны вирусы ящура, жёлтой лихорадки, бешенства, полиомиелита, кори, гриппа, клещевого энцефалита). Всего же более 20 нобелевских лауреатов обязаны своими открытиями в области вирусологии Д. И. Ивановскому [13].

В целом, вирусы содержат только один вид нуклеиновой кислоты - либо ДНК, либо РНК. Вирусные нуклеиновые кислоты бывают одно- и двухцепочечные, а вирусный геном может состоять из одной или нескольких молекул нуклеиновой кислоты, и если он состоит из одной молекулы, она может быть линейной или кольцевой. Белковый чехол, или белковая трубка, вирусов со спиральной симметрией называется капсидом. Он может быть "голым" или заключённым в липопротеидную оболочку (пеплюс), образующуюся из клеточных мембран.

Для вирусов характерно исключительное разнообразие структурной и функциональной организации генома. Геном может быть представлен

одной молекулой нуклеиновой кислоты или, напротив, фрагментами, каждый из которых содержит один или несколько генов. Геномная РНК может быть двунитчатой или одонитчатой.

Размножение вирусов представляет собой тесное взаимодействие клеточных и вирусных молекул. Инфицированная клетка в одно и тоже время является и внешней средой, и как бы частью собственной организации вируса, без которой невозможна реализация его генетической информации. Особенность системы вирус-клетка заключается в наличии двух геномов. В первом случае вирусная нуклеиновая кислота реплицируется, подчиняясь собственным контрольным механизмам. Во втором синтез вирусной нуклеиновой кислоты контролируется клеточным геномом.

Вирусы растений, животных и бактерий обладают многими общими свойствами, но нет доказательств, что тот или иной вирус способен проходить свой полный цикл в растениях и позвоночных или в растениях и бактериях [6].

Все изученные вирусы растений содержат РНК, за исключением вируса мозаики цветной капусты, который содержит двухцепочечную ДНК. Вирусы растений обычно проникают в организм хозяина только через травмы, ибо плотная наружная оболочка растительной клетки непроницаема для них. Репликация вирусов растений, по-видимому, катализируется специфическими репликазами (РНК-зависимыми РНК-полимеразами) [8].

Одним из интереснейших представителей вирусов растений является вирус штриховатой мозаики ячменя (ВШМЯ), который привлёк внимание исследователей ещё в 1963 году, когда было обнаружено, что инфицирование этим вирусом растений кукурузы приводит к изменению соотношения доминантных и рецессивных признаков при расщеплении в F_2 – вместо ожидаемого отношения 3:1 было получено – 2:1 [24].

Мутагенный эффект в значительной мере объясняется способностью ВШМЯ, в отличие от большинства вирусов растений, проникать в апикальную меристему и локализоваться в генеративных клетках растений, и соответственно – в семенах.

Перенос вирусов семенами наблюдается редко, а перенос пыльцой ещё реже. Особенности процесса морфогенеза цветка, очевидно, таковы, что они препятствуют проникновению вирусов в гаметы. Вообще же клетки апикальных меристем, заражённых вирусом растений, как правило, содержат мало вирусных частиц или свободны от них [1, 4, 5].

В настоящей обзорной статье рассматриваются генетические эффекты и молекулярно-биологические характеристики Северо-Кавказского штамма ВШМЯ.

Исследования генетических эффектов ВШМЯ

Штриховатая мозаика ячменя, заболевание, вызываемое ВШМЯ, была открыта и названа ложной полосатостью ячменя почти 100 лет назад, а в 1924 году была предположена его вирусная природа.

Способность вируса передаваться механически от растения к растению была продемонстрирована более 50 лет назад. Существуют многочисленные штаммы ВШМЯ, вызывающие различные симптомы болезни. Легкость механической передачи вируса от растения к растению в поле способствует быстрому попаданию вируса в проростки ячменя, а также может привести к высокой доле зараженных семян и серьезным потерям урожая.

Другой предполагаемый способ передачи вируса – через пыльцу, при котором происходит заражение растений, произрастающих на удалении от источника инфекции. Однако, в непосредственных полевых испытаниях и в лабораторных опытах, передача через пыльцу не была обнаружена и, следовательно, не может представляться существенным фактором в распространении вируса.

Так как передача вируса через семена необходима для его выживания от сезона к сезону, можно использовать чувствительные диагностические методы для выявления и устранения зараженных семян. В результате, распространение ВШМЯ заметно снизилось там, где для производства ячменя применяются современные сельскохозяйственные технологии. Но вирус все еще может представлять собой проблему в развивающихся странах, которые не в состоянии применять эффективные методы борьбы с вирусными болезнями [10].

Генетические и молекулярно-биологические исследования ВШМЯ в Краснодарском научно-исследовательском институте сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко (КНИИСХ) были инициированы в связи с попытками сотрудника института Алексея Михайловича Бурдуна (1937-2015) использовать выраженную мутагенную активность этого вируса в практической селекции. Как сказано А. М. Бурдуном в его диссертации на соискание степени доктора биологических наук (1992 г.): «...велись, совместно с И. В. Панариным и В. С. Забавиной исследования закономерностей рекомбиногенеза и открыто явление реабилитации полиморфизма вида на основе отдельной особи, что сняло опасения утери генофонда и повысило уверенность в получении новых и существовавших ранее, но утерянных форм; были разработаны способы индукции нестабильности генома, в том числе с помощью вируса штриховатой мозаики ячменя и переноса генов из одной особи в другую неполовым путём» [15].

Уникальные свойства ВШМЯ проникать в апикальную меристему растений и локализоваться в генеративных органах и в зерне на определённом этапе привлекло к нему внимание представителей зарождающейся генной инженерии растений как возможного кандидата на роль векторной молекулы, способной перенести нужные человеку гены в

растение-мишень. Поэтому А. М. Бурдун, получив при помощи ВШМЯ новый сорт яровой пшеницы, назвал его «Вектор».

Размножение вирусов в клетке приводит к изменению ионного состава и кислотности внутриклеточной среды [8], что является причиной массовых передвижение мигрирующих генетических элементов (МГЭ) и определяет вспышку мутаций разных генов [20, 21]. Была установлена способность ВШМЯ индуцировать резкое (более чем в 50 раз) увеличение выхода триплоидов и анеуплоидов у ячменя и мягкой пшеницы [22, 23]. Кроме того, было показано, что инокуляция ВШМЯ в проростки мягкой пшеницы вызывала значительное повышение полиморфизма по ряду хозяйственно-ценных признаков [2].

В КНИИСХ была проведена работа по оценке мутагенного эффекта ВШМЯ в процессе отбора по разным признакам у ярового ячменя [7, 11]. Представлялось принципиально важным изучить возможность совместной инокуляции ВШМЯ с экзогенными нуклеиновыми кислотами, так как ещё до установления биологической роли ДНК (в 30-40-е годы XX века) советский генетик С. М. Гершензон показал мутагенный эффект экзогенных нуклеиновых кислот на дрозофиле [3]. Были основания предполагать, что ВШМЯ может способствовать проникновению экзогенных нуклеиновых кислот в клетки реципиенты.

Дело в том, что Эберт (1959) имплантировал 11-дневным куриным эмбрионам микросомную фракцию, полученную из мышцы сердца куриного эмбриона или цыплёнка, или смесь этой фракции с вирусом саркомы Рауса. Прививка только микросомной фракцией не давала никакого эффекта. Инокуляция только вируса саркомы Рауса вела к образованию опухоли. В то же время прививка, осуществляемая смесью микросомной фракции вместе с вирусом саркомы Рауса в 27 % случаев индуцировала образование в хориаллантаоидной мембране сердечно-мышечных волокон и подобных им образований [14].

Таким образом, ожидалось, что совместная инокуляция ВШМЯ с экзогенными нуклеиновыми кислотами усилит мутагенный эффект.

В опытах был использован сорт ярового ячменя Курьер (разновидность нутанс, содержание белка 12,1-13,0 %). Источником микросом и экзогенных нуклеиновых кислот служил овёс сорта Астор. Микросомы выделяли из созревающего зерна овса методом преципитации аскорбиновой кислотой [18]. Полученный препарат суспензировали в дистиллированной воде и смешивали с соком из растений ячменя, поражённых ВШМЯ [2], в соотношении микросомы из 100 г зерна овса + 12 мл дистиллированной воды + 20 мл сока. Нуклеиновые кислоты выделяли из созревающего зерна овса, а также зелёной массы ячменя, содержащей ВШМЯ, с использованием тиоцианата гуанидия [16], следы которого устраняли многократной отмывкой осадка нуклеиновых кислот этанолом. В противном случае, следы тиоцианата гуанидия вызывали отравление: в ближайшие часы после обработки растения увядали и ложились на землю [11].

С целью предотвращения ферментативного автолиза микросом и вируса в одном из вариантов использовали мощный ингибитор рибонуклеаз диэтилпиروкарбонат (ДЭПК) в концентрации 0,01 %. ДЭПК быстро разлагается в присутствии воды до углекислого газа и этанола и не может оказывать каких-либо влияний на дальнейший ход эксперимента.

Растения ячменя выращивали в поле в июне, что исключало переопыление их пыльцой других сортов. Заражение растений ВШМЯ проводили по методике, описанной в работе [2], путем натирания листьев проростков томпоном, смоченным в испытуемом растворе, в присутствии абразивного материала (SiO_2).

По каждому варианту опыта заражали около 200 растений. Варианты опыта: 1) Контроль – 626 линий из сорта Курьер; 2) Курьер + ВШМЯ – 235 семей; 3) То же, что №2 + микросомы овса (МС) – 268 семей; 4) То же что

№3 + ДЭПК – 350 семей; 5) Курьер + нуклеиновые кислоты ВШМЯ и овса (НК) – 265 семей.

В полевых условиях проводили отбор по дате колошения, характеру остей, типу колоса и урожайности. В таблице представлены данные о частотах мутирования под действием ВШМЯ и различных вариантов комплексных воздействий. Несмотря на значительное превышение количества линий контрольного варианта, в нём не было обнаружено ни одного случая макромутаций, тогда как в остальных – частота мутирования колебалась от 2,61 до 0,29 %.

Таблица – ЧАСТОТА МУТИРОВАНИЯ ПРИ ОТБОРЕ ИЗ СОРТА ЯЧМЕНЯ КУРЬЕР, ИНФИЦИРОВАННОГО ВИРУСОМ ШТРИХОВАТОЙ МОЗАИКИ ЯЧМЕНЯ [7]

Вариант	Кол-во линий	Частота мутирования по признакам, %					
		содержание белка, %		дата колошения		масса зерна с рядка, г	
		14,0-14,9	15,0-15,9	18-20.05	21-24.05	200-299	300-400
1.Контроль	626	0	0	0	0	2,24	0,1
2.ВШМЯ	235	0,85*	0,85*	0	0	3,00*	0
3.ВШМЯ+МС	268	2,61**	0,37	1,87**	0,75**	1,12	0,37*
4.ВШМЯ+МС+ДПЭК	350	0,86**	0,29	0,57	0,57*	2,86*	1,15**
5.НК ВШМЯ и овса	265	0,38*	0	0	0,75**	2,64	0,38*

* - достоверно при $P < 0,05$; ** - достоверно при $P < 0,01$.

По вариантам 3, 4 и 5 выделились образцы с высоким уровнем урожайности. Ряд скороспелых мутантов имели повышенное содержание белка. Из данных следует, что сам ВШМЯ и ВШМЯ в комплексе с МС и НК способен индуцировать мутации, характеризующиеся значительными изменениями в геноме.

Увеличение мутагенного эффекта ВШМЯ при добавлении МС и НК позволяет предположить, что этот вирус может способствовать

проникновению в клетки экзогенных нуклеиновых кислот при совместной инокуляции. Использование ДЭПК способствовало получению форм с различным выражением биохимических и морфологических признаков, что можно объяснить увеличением титра биологически активных РНК вирусов и микросом.

В этом эксперименте нет данных, позволяющих утверждать, что описанные мутации являются следствием миграции мобильных генетических экспериментов под влиянием "геномного стресса", однако следует подчеркнуть, что в отличие от хемо- и радиомутагенеза в первом и во втором поколениях не наблюдалось появления хлорофильных мутаций, а сам спектр мутирования в основном не затрагивал выраженных морфологических признаков (тип колоса и т.п.). Лишь в пятом варианте (НК ВШМЯ и овса) удалось обнаружить в M_2 несколько растений с гладкими и частично гладкими остями (медикум и субмедикум). В одной семье M_3 было обнаружено расщепление по типу колоса: нутанс-промежуточный тип колоса (интермедикум). Потомство промежуточного типа расщеплялось по типу колоса в отношении – 13 промежуточного типа : 10 двурядного типа : 13 многорядного типа : 2 промежуточного многорядного типа, что очень близко к отношению 1:1:1:0,2 и не соответствует ожидаемому 9:3:3:1. Как упоминалось выше, такого рода абберантные отношения наблюдались ранее на кукурузе [24].

Молекулярно-биологические характеристики

Северо-Кавказского штамма ВШМЯ

Как и у всех представителей *Hordeivirus* геномная РНК ВШМЯ кодируют семь основных белков: метилтрансферазная/хеликазная и полимеразная субъединицы РНК-зависимой РНК-полимеразы, белок оболочки, три белка TGB, обеспечивающие передвижение вируса локально и от клетки к клетке, и белок патогенности. Возможно, для функционирования белкового комплекса РНК-зависимой РНК-полимеразы

необходимы также несколько хозяйских белков, но эти белки еще не идентифицированы [10].

Выделение ВШМЯ и получение его РНК. Для эффективного препаративного выделения вируса большое значение имеет правильный выбор растения-хозяина, в котором он накапливался бы в наибольшем количестве. Использованный сорт ярового ячменя "Каскад" оказался в этом отношении удачным. Вирус накапливался в нём в большом количестве с хорошими проявлениями симптомов болезни.

Выделение вирусов основывается на использовании специфических свойств, отличающих их от компонентов клеток-хозяев. Обычно первая стадия выделения сводится к разрушению клеток и экстракции клеточного сока, в котором он локализуется. Сок представляет собой сложную смесь, содержащую различные ингредиенты клетки, в том числе ферменты, способные разрушать некоторые компоненты экстракта или инактивировать некоторые вирусы. Большинство крупных компонентов клеточного сока (пластиды, митохондрии, фрагменты клеточной стенки и др.) быстро оседают и от них можно легко избавиться низкоскоростным центрифугированием. В соке присутствуют и низкомолекулярные растворимые вещества – сахара, соли, аминокислоты. Наконец, в состав сока входят растительные белки, рибосомы, микросомы, занимающие промежуточное положение между рассмотренными выше группами. Они наиболее близки к вирусам по размерам, составу и стабильности и от них труднее всего освободиться при очистке. Эти компоненты можно отделить от целевого объекта температурной денатурацией (при условии температурной стабильности вирусных частиц) с последующей процедурой низкоскоростного центрифугирования, а также дифференциальным центрифугированием. Сок растений имеет, как правило, довольно низкое значение рН, а большинство вирусов стабильны при рН близком к нейтральному, поэтому рекомендуется некоторое

подщелачивание экстракта и проводить выделение в забуференных растворах.

Для определения степени чистоты полученного препарата обычно используются данные электронной микроскопии и спектрофотометрического анализа ВШМЯ. Отсутствие видимых примесей в поле зрения электронного микроскопа (Рисунок 1), а также отношение величин абсорбции ультрафиолета при длинах волн 260 и 280 нм равное единице ($A_{260}/A_{280}=1,0$), говорят о достаточной очистке вируса от полирибосом (для которых $A_{260}/A_{280}=1,3$) и других субклеточных структур.



Рисунок 1. Электронная микрофотография вируса штриховатой мозаики ячменя (ВШМЯ, увеличение 60 000 раз) [11].

ВШМЯ в отличие от большинства вирусов растений содержит очень мало РНК – всего лишь 4 % от массы вируса. Для сравнения ВТМ содержит 50 % РНК. Тем не менее, выделение РНК ВШМЯ вполне успешно осуществляли классическим фенольно-детергентным методом.

Изучение компонентного состава РНК ВШМЯ. Известно, что вирус штриховатой мозаики ячменя относится к группе многокомпонентных вирусов, полный геном которых состоит из нескольких обособленных друг

от друга единиц. Различные штаммы ВШМЯ могут иметь два, три или четыре геномных компонента, различающихся по молекулярной массе и функциональным особенностям. При электрофорезе в 3 %-ом ПААГ РНК было показано, что местный Северокавказский штамм ВШМЯ оказался трёхкомпонентным (Рисунок 2) с характерно специфическим соотношением компонентов РНК (1:2:1), т.е. преобладающим является РНК компонент №2.

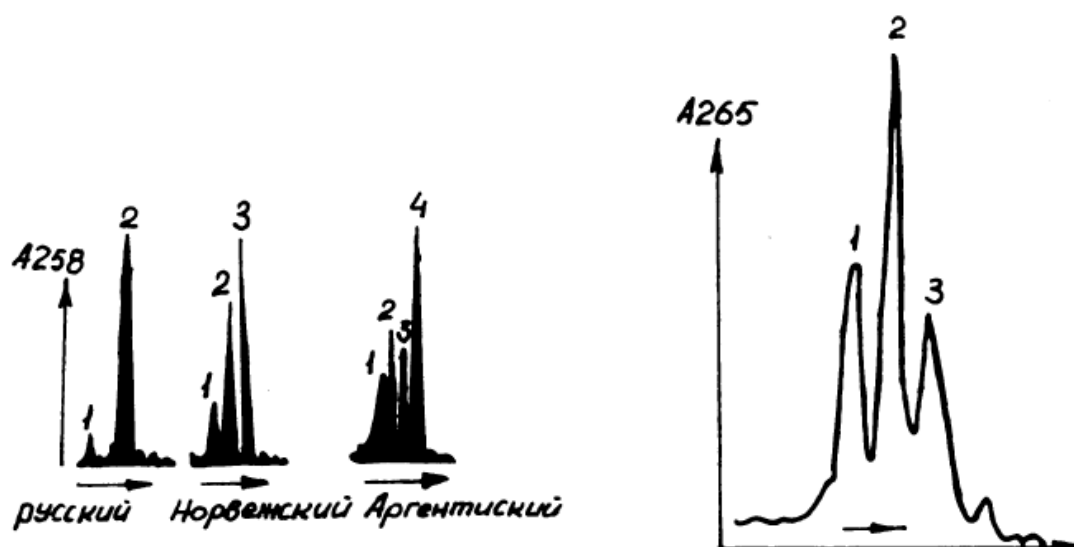


Рисунок 2. Электрофорез суммарной РНК вируса штриховатой мозаики ячменя (ВШМЯ), штамм Северо-Кавказский [11].

Для сравнения на рис. 2 показаны электрофореграммы РНК ВШМЯ штаммов Русский, Норвич и Аргентинский мягкий, взятые из литературы [4, 5].

Хроматографическое исследование РНК ВШМЯ. Ионообменная хроматография на МАК – метилированном сывороточном альбумине, сорбированном на кизельгуре (разновидность SiO_2), является действенным способом изучения нуклеиновых кислот вирусов. Однако характер разделения РНК ВШМЯ оказался иным, чем в случае электрофореза. В отличие от электрофореза, где разделение РНК происходит только по молекулярному весу, ионообменная хроматография позволяет разделить

нуклеиновые кислоты ещё и по особенностям нуклеотидного состава и вторичной структуры.

Нуклеиновые кислоты являются полианионами и поэтому с метилированным альбумином (поликатион) они связываются ионными связями. Прочность этих связей зависит от концентрации солей в водной фазе колонки. При постепенном увеличении концентрации хлористого натрия в растворе нуклеиновые кислоты элюируются с колонки. Причём порядок элюции коррелирует с их молекулярной массой. Молекулы с меньшей молекулярной массой элюируют с колонки первыми, а более крупные – позже. Двухцепочечные нуклеиновые кислоты связываются с МАК менее прочно, чем их одноцепочечные компоненты.

Некоторые нуклеиновые кислоты плохо элюируются с колонки градиентом солей. К их числу относят мРНК эукариот и вирусоспецифические многоцепочечные РНК. Эти нуклеиновые кислоты можно элюировать с колонки МАК при повышении температуры до 98°C.

Фракционирование на колонке МАК показало, что половина препарата РНК ВШМЯ сходила с колонки при концентрации хлористого натрия 0,75 – 1 М. Это свидетельствует о том, что выделенная РНК ВШМЯ является высокомолекулярной. Однако РНК элюировалась одним ассиметричным пиком, без подразделения на отдельные фракции (рис. 3). По-видимому, различия по молекулярному весу нивелировались особенностями нуклеотидного состава. Аналогичный профиль элюции в солевом градиенте имела РНК вируса полиомиелита [5].

Другая половина препарата РНК ВШМЯ прочно связывалась с МАК и элюировалась с колонки только при 98°C (Рисунок 3). Это свидетельствует о том, что РНК ВШМЯ состоит из двух субпопуляций РНК, различающихся по особенностям нуклеотидного состава и вторичной структуры.

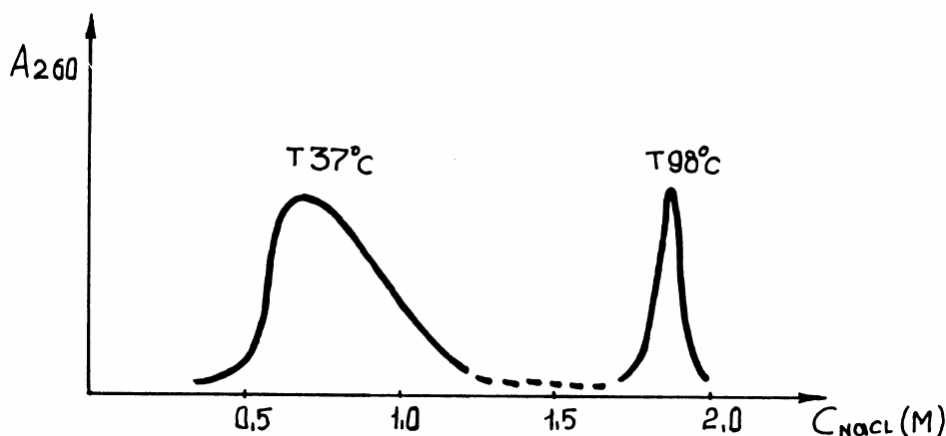


Рисунок 3. Фракционирование на колонке МАК (метилованный альбумин-кieselгур) препарата суммарной РНК вируса штриховатой мозаики ячменя (ВШМЯ), штамм Кавказский [11]

Известно, что РНК ВШМЯ имеет поли (А)-последовательности (от 8 до 40 нуклеотидов), которые локализованы внутри молекулы [4, 5]. Это позволяет фракционировать РНК ВШМЯ аффинной хроматографией на поли-(У)-сефарозе, подразделяя поли-(А)⁺ и поли-(А)⁻ фракции РНК. Этот метод позволил получить информацию о характерной особенности нуклеотидного состава солевой и температурной фракции вирусной РНК. Оказалось, что солевая фракция на 15 % представлена поли-(А)⁺ РНК, а температурная – только на 3 %. Это говорит о том, что прочность взаимодействия с МАК температурной фракции определяется не нуклеотидным составом, поскольку известно, что поли-(А) усиливает связь с МАК, а особенностями вторичной структуры РНК. Менее закрытая вторичная структура (большое количество свободных фосфатных групп) обеспечивает более прочное связывание с МАК.

Заключение

Палочковидные спиральные частицы ВШМЯ имеют большое внешнее сходство с вирионами вируса табачной мозаики (ВТМ), однако существенно отличаются от них по параметрам спирали (шаг, внешний

диаметр и диаметр внутреннего канала). Сравнение первичной структуры белков оболочки ВШМЯ и ВТМ, ставшее возможным после секвенирования генома ВШМЯ, показало, что эти белки не являются близкородственными (гомология 17 %) [17].

Итак, ВШМЯ относится к группе многокомпонентных вирусов с функционально фрагментированным геномом. Полный геном вируса представлен "плюс" цепями РНК и состоит из четырёх (штаммы Аргентинский мягкий, Северная Дакота 161), трёх (Норвич, Северная Дакота 18), двух (Типичный, Русский, Северная Дакота 129) компонентов.

Индивидуальные РНК вируса заключены в отдельные капсиды и различаются по молекулярной массе: РНК 1 – $1,35 \times 10^6$; РНК 2 – $1,10 \times 10^6$; РНК 3 – $1,00 \times 10^6$; РНК 4 – $0,85 \times 10^6$. С примерной длиной цепи соответственно 4200, 3650, 3250 и 2950 нуклеотидов. Кроме того, показано, что РНК 2 функционально делится на два типа молекул: РНК 2а и РНК 2б, имеющие одинаковые молекулярные массы, но различные первичные последовательности.

Для нормального функционирования вируса в заражённом растении необходимо присутствие в инокуляте всех типов геномных РНК. Исключение составляет РНК 4, утрата которой не приводит к потере инфекционности (что и наблюдается в Северо-кавказском штамме ВШМЯ). Кроме РНК 4 в смеси вирусных РНК было обнаружено два типа субгеномных РНК с молекулярными массами $0,25 \times 10^6$ и $0,70 \times 10^6$. Первая из них составляет менее 1% препарата РНК, а вторая содержится ещё в меньшем количестве.

ВШМЯ обладает ещё одной интересной способностью: соотношение индивидуальных РНК может изменяться в зависимости от условий размножения штамма. РНК 4, а затем и РНК 3 способны утрачиваться при пассировании вируса. Предполагается, что неблагоприятные условия приводят к преимуществам двухкомпонентного варианта ВШМЯ, но

остаётся открытым вопрос о том, является ли утрата РНК 4 и 3 истинной трансформацией трёх- и четырёхкомпонентных изолятов в двухкомпонентный или происходит отбор минорной примеси двухкомпонентного штамма, загрязняющего исходный препарат.

На 5'-конце вирусная РНК несёт метилированный и инвертированный гуанозин – так называемую КЭП-структуру подобно мРНК эукариотических клеток, а на 3'-конце тРНК-подобную структуру, способную акцептировать тирозин. Уникальной особенностью РНК ВШМЯ является внутренняя поли-(А)-последовательность, делящая РНК вируса на кодирующую L-область и некодирующую Sh-область, содержащую тРНК-подобную структуру. В зависимости от длины поли(А)-последовательности РНК вируса может сорбироваться на колонке с аффинным сорбентом, образуя поли-(А)⁻ и поли-(А)⁺ фракции. Инфекционность фракций одинакова, но соотношение индивидуальных геномных компонентов в них представлены сильно изменёнными по сравнению с тотальной вирусной РНК. У всех изученных штаммов большая часть РНК 1 присутствовала в поли-(А)⁺ фракции, а поли-(А)⁻ фракция содержала основную часть РНК 2. РНК 3 и распределялась между этими фракциями примерно поровну, а РНК 4 была основным компонентом фракции поли-(А)⁺ РНК.

Индивидуальные РНК вируса имеют значительные области гомологии. Транслируются геномные компоненты ВШМЯ подобно мРНК эукариот как моноцистронные матрицы [5] при этом РНК вируса являются очень эффективными матрицами, предпочтительно связываясь с рибосомами клетки растения-хозяина. В этом они схожи с мРНК запасных белков, преимущественно иницирующих трансляцию в созревающем зерне в присутствии мРНК других белков [11].

Первые этапы исследований молекулярно-биологических характеристик ВШМЯ (1970-1980-е годы) проводились с применением

бесклеточной системы синтеза белка [1, 4, 5] и позволили оценить экспрессию РНК вируса. Методами генной инженерии [17, 20, 21], удалось установить роль ВШМЯ в перемещении мобильных генетических элементов и в явлении вирус-индуцированного сайленсинга генов (молчания генов) [11,17], что и является причиной выраженной мутационной активности ВШМЯ.

Главной причиной того, что наука оказалась плохо готова к пандемии корона-вируса, по-видимому, является то, что последние десятилетия развивалось в основном генно-инженерное направление (так называемый «майн-стрим») в ущерб исследованиям белоксинтезирующего аппарата клетки, который является основной мишенью вируса.

Литература

1. Аграновский, А. А. Изучение особенностей концевых структур РНК вируса штриховатой мозаики ячменя: автореф. дисс. ... канд. биол. наук / Аграновский Алексей Анатольевич. – М.: МГУ, 1981. – 22 с.
2. Бурдун, А.М. Методические указания по получению рекомбинаций пшеницы с помощью вируса штриховатой мозаики ячменя / А.М. Бурдун, И.В. Панарин, Е.С. Забавина. – Краснодар, 1984.
3. Гершензон, С.М. Мутагенное действие ДНК и вирусов у дрозофилы / С.М. Гершензон, Ю.Н. Александров, С.С. Малюта. – Киев: Наукова думка, 1975. – 68 с.
4. Доля, В. В. Изучение продуктов трансляции отдельных компонентов генома вируса штриховатой мозаики ячменя: автореф. дисс. ... канд. биол. наук / Доля Валерьян Владимирович. – М.: МГУ, 1980. – 21 с.
5. Доля, В. В. Структура и экспрессия генома гордеивирусов: автореф. дисс. ... докт. биол. наук / Доля Валерьян Владимирович. – М.: МГУ, 1987. – 53 с.
6. Лурия, С. Общая вирусология / Лурия С. и др. – М.: Мир, 1981. – 680 с.
7. Мухсинов, В.Х. К вопросу о мутагенном эффекте вируса штриховатой мозаики ячменя у ярового ячменя / В.Х. Мухсинов, И.В. Панарин, Е.О. Монастырская // Биохимическая оценка белков зерновых культур в связи с задачами на качество. Сб. науч. тр. КНИИСХ им. П.П. Лукьяненко. – Краснодар, 1985. – С. 48-52.
8. Мэтьюз, Р. Вирусы растений / Р. Мэтьюз. – М.: Мир, 1973. – 600 с.
9. Насонов, А.И. Взаимосвязь содержания катионов магния (Mg^{++}), стабильности РНК и интенсивности метаболизма в клетках эукариот / А.И. Насонов, С.Л. Полежаев, А.П. Радуль, В.Г. Рядчиков, В.К. Плотников // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2008, 2(11). – С.104-110.
10. Печникова, Е. В. Структура вируса штриховатой мозаики ячменя и гигантских бактериофагов EL и Lin68 по данным криоэлектронной микроскопии: дисс. ... канд. биол. наук / Печникова Евгения Викторовна. – М.: МГУ, 2015. – 138 с.
11. Плотников, В.К. Биология РНК зерновых культур / В.К. Плотников – Краснодар: ЭДВИ, 2009. – 375 с.

12. Плотников, В.К. Евгений Витальевич Ананьев (1947–2008). Письма в Вавиловский журнал / В.К. Плотников. – 2016. http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/history_of_Genetics/appx_4.pdf
13. Соснов, А. Разглядевший невидимок (приоритет российского учёного в открытии вирусов неоспорим) / А. Соснов // Газета «Поиск». – 2020, № 16-17, 24 апреля. – С. 13.
14. Уманский, К.Г. Роль вирусов в природе / К.Г. Уманский – М.: Знание, 1981. – 64 с.
15. Шеуджен, А.Х. На службе земли Кубанской / А.Х. Шеуджен, Е.М. Харитонов, Т.Н. Бондарева. – Майкоп: РИПО «Адыгея», 1999. – 552 с.
16. Chirgvin, J.N. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease / J.N. Chirgvin, A.E. Praybia, R.J. MacDonald, W.J. Rutter // *Biochemistry*. – 1979. – V.18. – P. 5294-5299.
17. Jackson, A.O. Hordeivirus replication, movement and pathogenesis / A.O. Jackson, H.S. Lim, J. Bragg, U. Ganessum, M.J. Lee // *Ann. Rev. Phytopathol.* – 2009. – V. 47 – P. 385-422.
18. Jagota, S.K. A new technique for the quicker separation of undamaged microsomes using ascorbic acid / S.K. Jagota, H.M. Danl // *Curr. Sci.* – 1980. – V. 49. – № 18. – P. 694-696.
19. Holzberg, S. Barley stripe mosaic virus-induced silencing in monocot plant / S. Holzberg, P. Brosio, C. Gross, G. Pogue // *The Plant Journal*. – 2002. – V. 30(3). – P. 315-327.
20. Mottinger, J.P. Mutations of the Adh 1 gene in maize following infection with barley stripe mosaic virus / J.P. Mottinger, M.A. Johnes, M. Freeling // *Mol. Gen. Genet.* – 1984. – V. 195. – P. 367-369.
21. Mottinger, J.P. Stable and unstable mutation in aberrant ratio stocks of maize / J.P. Mottinger, S.G. Dellaporte, P.B. Keller // *Genetics*. – 1984. – V. 106. – P. 751-767.
22. Sandfaer, J. The influence of barley stripe mosaic virus on the frequency of triploids and aneuploids in barley / J. Sandfaer // *Barley Genet. Newsletter*. – 1972. – V. 2. – P. 72-73.
23. Sandfaer, J. Barley stripe mosaic virus and frequency of triploids and aneuploids in wheat / J. Sandfaer // *Genetics*. – 1973. – V.73. – P. 4-6.
24. Sprague, G. Virus as mutagenic agent in maize / G. Sprague, H.H. McKinney, I. Greely // *Science*. – 1963. – V. 67. – P. 1052-1053.

References

1. Agranovskij, A. A. Izuchenie osobennostej koncevnyh struktur RNK virusa shtrihovatoj mozaiki jachmenja: avtoref. diss. ... kand. biol. nauk / Agranovskij Aleksej Anatol'evich. – М.: MGU, 1981. – 22 s.
2. Burdun, A.M. Metodicheskie ukazaniya po polucheniju rekombinacij pshenicy s pomoshh'ju virusa shtrihovatoj mozaiki jachmenja / A.M. Burdun, I.V. Panarin, E.S. Zabavina. – Krasnodar, 1984.
3. Gershenzon, S.M. Mutagennoe dejstvie DNK i virusov u drozofily / S.M. Gershenzon, Ju.N. Aleksandrov, S.S. Maljuta. – Kiev: Naukova dumka, 1975. – 68 s.
4. Dolja, V. V. Izuchenie produktov transljaccii ot del'nyh komponentov genoma virusa shtrihovatoj mozaiki jachmenja: avtoref. diss. ... kand. biol. nauk / Dolja Valer'jan Vladimirovich. – М.: MGU, 1980. – 21 s.
5. Dolja, V. V. Struktura i jekspressija genoma gordeivirusov: avtoref. diss. ... dokt. biol. nauk / Dolja Valer'jan Vladimirovich. – М.: MGU, 1987. – 53 s.
6. Lurija, S. Obshhaja virusologija / Lurija S. i dr. – М.: Mir, 1981. – 680 s.

7. Muhsinov, V.H. K voprosu o mutagennom jeffekte virusa shtrihovatoj mozaiki jachmenja u jarovogo jachmenja / V.H. Muhsinov, I.V. Panarin, E.O. Monastyrskaja // Biohimicheskaja ocenka belkov zernovyh kul'tur v svjazi s zadachami na kachestvo. Sb. nauch. tr. KNIISH im. P.P. Luk'janenko. – Krasnodar, 1985. – S. 48-52.
8. Mjet'juz, R. Virusy rastenij / R. Mjet'juz. – M.: Mir, 1973. – 600 s.
9. Nasonov, A.I. Vzaimosvjaz' sodержanija kationov magnija (Mg⁺⁺), stabil'nosti RNK i intensivnosti metabolizma v kletkah jeukariot / A.I. Nasonov, S.L. Polezhaev, A.P. Radul', V.G. Rjadchikov, V.K. Plotnikov // Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 2008, 2(11). – S.104-110.
10. Pechnikova, E. V. Struktura virusa shtrihovatoj mozaiki jachmenja i gigantskih bakteriofagov EL i Lin68 po dannym krioelektronnoj mikroskopii: diss. ... kand. biol. nauk / Pechnikova Evgenija Viktorovna. – M.: MGU, 2015. –138 s.
11. Plotnikov, V.K. Biologija RNK zernovyh kul'tur / V.K. Plotnikov – Krasnodar: JeDVI, 2009. – 375 s.
12. Plotnikov, V.K. Evgenij Vital'evich Anan'ev (1947–2008). Pis'ma v Vavilovskij zhurnal / V.K. Plotnikov. – 2016. http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/history_of_Genetics/appx_4.pdf
13. Sosnov, A. Razgljadevshij nevidimok (prioritet rossijskogo uchjonogo v otkrytii virusov neosporim) / A. Sosnov // Gazeta «Poisk». – 2020, № 16-17, 24 aprelja. – S. 13.
14. Umanskij, K.G. Rol' virusov v prirode / K.G. Umanskij – M.: Znanie, 1981. – 64 s.
15. Sheudzhen, A.H. Na sluzhbe zemli Kubanskoj / A.H. Sheudzhen, E.M. Haritonov, T.N. Bondareva. – Majkop: RIPO «Adygeja», 1999. – 552 s.
16. Chirgvin, J.N. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease / J.N. Chirgvin, A.E. Praybia, R.J. MacDonald, W.J. Rutter // Biochemistry. – 1979. – V.18. – P. 5294-5299.
17. Jackson, A.O. Hordeivirus replication, movement and pathogenesis / A.O. Jackson, H.S. Lim, J. Bragg, U. Ganessum, M.J. Lee // Ann. Rev. Phytopathol. – 2009. – V. 47 – P. 385-422.
18. Jagota, S.K. A new technique for the quicker separation of undamaged microsomes using ascorbic acid / S.K. Jagota, H.M. Danl // Curr. Sci. – 1980. – V. 49. – № 18. – P. 694- 696.
19. Holzberg, S. Barley stripe mosaic virus-induced silencing in monocot plant / S. Holzberg, P. Brosio, C. Gross, G. Pogue // The Plant Journal. – 2002. – V. 30(3). – P. 315-327.
20. Mottinger, J.P. Mutations of the Adh 1 gene in maize following infection with barley stripe mosaic virus / J.P. Mottinger, M.A. Johnes, M. Freeling // Mol. Gen. Genet. – 1984. – V. 195. – P. 367-369.
21. Mottinger, J.P. Stable and unstable mutation in abberant ratio stocks of maize / J.P. Mottinger, S.G. Dellaporte, P.B. Keller // Genetics. – 1984. – V. 106. – P. 751-767.
22. Sandfaer, J. The influence of barley stripe mosaic virus on the frequency of triploids and aneuploids in barley / J. Sandfaer // Barley Genet. Newsletter. – 1972. – V. 2. – P. 72-73.
23. Sandfaer, J. Barley stripe mosaic virus and frequency of triploids and aneuploids in wheat / J. Sandfaer // Genetics. – 1973. – V.73. – P. 4-6.
24. Sprague, G. Virus as mutagenic agent in maize / G. Sprague, H.H. McKinney, I. Greely // Science. – 1963. – V. 67. – P. 1052-1053.