

К механизмам антивирусной активности бактерий рода *Bacillus* на растениях картофеля

© 2019. Р. М. Хайруллин¹, д. б. н., г. н. с., Г. Ф. Бурханова¹, к. б. н., н. с.,
А. В. Сорокань¹, к. б. н., н. с., Е. Р. Сарварова¹, м. н. с.,
С. В. Веселова¹, к. б. н., с. н. с., Е. А. Черепанова¹, к. б. н., н. с.,
С. Г. Вологин², к. б. н., в. н. с., Ф. Ф. Замалиева², д. с.-х. н., г. н. с.,
И. В. Максимов¹, д. б. н., зав. лабораторией,

¹Институт биохимии и генетики Уфимского федерального
исследовательского центра Российской академии наук,
450054, Россия, г. Уфа, проспект Октября, д. 71, литер 1Е,

²Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Федерального
исследовательского центра
«Казанский научный центр Российской академии наук»,
420059, Россия, г. Казань, ул. Оренбургский тракт, д. 48,
e-mail: krm62@mail.ru

Вирусные заболевания ежегодно вызывают потери урожая и заметное снижение качества продукции растениеводства, в том числе важнейшей сельскохозяйственной культуры – картофеля (*Solanum tuberosum* L.). Антивирусных препаратов для растениеводства практически нет и, в этих условиях, использование биопрепаратов на основе эндофитных микроорганизмов, продуцирующих РНКазы, является перспективным методом защиты растений от вирусов. Проведён анализ способности штаммов бактерий *Bacillus* spp. влиять на поражение растений картофеля вирусами, а также продуцировать РНКазы. Обнаружено, что обработка штаммами бактерий *B. subtilis* 26Д и ВКПМ-5689 снижала уровень инфицированности растений вирусами более, чем на две трети в сравнении с контролем. При использовании комбинированного препарата МИКС (*B. subtilis* 26Д + *B. thuringiensis* ВКПМ-5689 + *B. thuringiensis* ВКПМ-6066) развитие Y-вируса картофеля (YVK) уменьшалось более, чем в 2 раза по сравнению с контрольными растениями. Впервые выявлено свойство этих штаммов бактерий секретировать РНКазы, способные, по мнению авторов, оказывать литический эффект на вирусы. Высказано предположение, что эндофитные штаммы *Bacillus* spp. с высокой РНКазной активностью являются перспективной основой экологически безопасных биопрепаратов для комплексной защиты растений.

Ключевые слова: картофель, микробиологические препараты, вирусы, РНКазы.

To the mechanisms of antiviral activity of *Bacillus* bacteria on potato plants

© 2019. R. M. Khairullin¹ ORCID: 0000-0001-8613-0786¹

G. F. Burkhanova¹ ORCID: 0000-0003-2346-3502¹, A. V. Sorokan¹ ORCID: 0000-0002-0443-7547¹

E. R. Sarvarova¹ ORCID: 0000-0002-0599-7618¹, S. V. Veselova¹ ORCID: 0000-0002-1219-2383¹

E. A. Cherepanova¹ ORCID: 0000-0002-9976-0944¹, S. G. Vologin² ORCID: 0000-0001-9173-7742²

F. F. Zamalieva² ORCID: 0000-0001-9110-5622², I. V. Maksimov¹ ORCID: 0000-0002-5707-3265¹

¹Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences,
Letter 1E, Building 71, Prospekt Oktyabrya, Ufa, Russia, 450054,

²Tatarstan Research and Development Institute of Agriculture – Subdivision of the Federal
Research Center “Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences”,
48, Orenburgsky Trakt, Kazan, Russia, 420059,
e-mail: krm62@mail.ru

sive viruses with dominant monogenic type of inheritance. Transgenic technologies and genome editing technologies temporarily is effective when genes encoding the synthesis of certain proteins that contribute to increasing the resistance of plants to insects – viruses vectors or viruses themselves, are introduced into the genome of a plant of a commercially valuable variety by genetic transformation. A new approach to form genetically modified insect and virus resistant plants through an RNA-interference mechanism is also known. In this regard, new methods of transport such RNA-insecticides by using specific symbiotic microorganisms living in the insect intestine or using endophytic bacteria are interesting. Some strains of such endophytes can theoretically exhibit high antiviral activity due to the ability to synthesize, for example, RNase that degrades the viral genome, or the ability to induce systemic resistance in plants, as well as to exhibit insecticidal properties. The use of biological preparation based on endophytic microorganisms producing RNase can be a promising method of protecting plants from viruses. The ability of *Bacillus* spp. strains to affect the lesion of potato plants by viruses, and also produce RNases in our work was analyzed. Potato plants of Udacha variety were grown in Bashkortostan in the field at the Birsky Experimental Station of the Bashkir Research Institute of Agriculture of the Ufa Federal Research Centre of the RAS, and of Nevsky variety were grown in the field at the Central Experimental Base of the Tatar Research Institute of Agriculture of Federal Research Center Kazan Scientific Center of RAS. It was found that plant treatment with bacterial strains *B. subtilis* 26D and VKPM-5689 reduced the degree of infection of plants with viruses by more than two-thirds in comparison with the control. When using the combined preparation MIX (*B. subtilis* 26D + *B. thuringiensis* VKPM-5689 + *B. thuringiensis* VKPM-6066), the development of Y-potato virus (YBK) decreased by more than 2 times compared to control plants. For the first time was revealed that these bacterial strains can secrete RNases, which, according to the authors, is capable of causing a lytic effect on viruses. Thus, it is shown that it is possible to increase the resistance of potato plants to viruses by means of preparations based on studied strains of bacteria, which can limit the spread of insect – as viral vectors, as well, probably can have a direct viricidal effect due to the production of RNases.

Keywords: potato, microbiological preparations, viruses, RNases.

Экологизация защиты растений является одним из приоритетных направлений современного растениеводства. Неконтролируемое использование химических средств защиты сельскохозяйственных культур, применение их в больших дозах оказывают значительное негативное воздействие на агроценозы. В этих условиях применение биопрепаратов на основе живых микроорганизмов (МО) представляет больший интерес.

Существенные потери урожая клубней картофеля *Solanum tuberosum* L. (до 30%) и заметное снижение их качества вызывается поражением растений вирусами, число видов которых не менее 40 [1]. Одним из главных путей борьбы с вирусной инфекцией остаётся селекция устойчивых сортов, но, к сожалению, источников генов иммунитета к агрессивным вирусам с доминантным моногенным типом наследования у растений не так много [2]. Временно эффективными оказались трансгенные технологии и технологии редактирования геномов, когда в геном растения хозяйственно ценного сорта путём генетической трансформации вводятся определённые гены, кодирующие синтез защитных растительных белков, чужеродных инсектотоксичных белков (например, Cru и Vip бактерий *B. thuringiensis*, интерферон) или вирусных белков [3], способные улучшить то или иное его свойство [4]. Известен также подход к созданию генетически модифицированных растений, устойчивых к насекомым и вирусам, с помощью механизма РНК-интерференции. Перспективность борьбы с вредителями на

основе РНК-интерференции обсуждается также в аспекте создания биоинсектицидов (их, на наш взгляд, можно назвать «RNAi-инсектицидами») [5, 6]. С позиции [7], необходимо создавать несколько видов «RNAi-инсектицидов» или вводить целую кассету (против насекомых, вирусов, и, может быть, грибных фитопатогенов) в геном растения, что является проблемой как с точки зрения биобезопасности, так и с позиции формирования впоследствии у патогенов и вредных насекомых устойчивости к действию токсичных веществ, продуцируемых модифицированными растениями. В связи с этим интересны новые способы доставки таких «РНК-инсектицидов» с помощью специфичных симбиотических МО, живущих в кишечнике только определённого вида вредного насекомого [7] или с использованием эндофитных бактерий, ассоциированных с определёнными видами сельскохозяйственных культур. Некоторые штаммы таких эндофитов, теоретически, могут проявлять и высокую антивирусную активность благодаря наличию пула, например, РНКаз, разрушающих вирусный геном, индукции у растений системной устойчивости, а также проявлению инсектицидных свойств. Так, выявлено многократное уменьшение степени поражения растений свёклы вирусом некротического пожелтения жилок (BNYVV) после их обработки бактерией *B. amylolequifaciens*, что коррелировало с уменьшением численности гриба *Polymyxa betae* и экспрессией растительных генов, кодирующих защитные белки (PR-8, NPR-1) [8]. Обнаружено, что бактерия

B. subtilis BS3A25 сдерживает развитие мозаики огурца на томатах посредством угнетения переносчика этого заболевания – бахчевой тли *Aphis gossypii* [9].

В связи с этим изучение свойств эндофитных бактерий *Bacillus* spp. является актуальным для создания биопрепаратов с комплексной (антивирусной, инсектицидной, фунгицидной, иммунизирующей и ростстимулирующей) активностью с целью экологически безопасной защиты растений картофеля от болезней и вредителей. Целью данной работы явилось исследование наличия РНКазной активности у эндофитных, а также неэндофитных инсектотоксичных бактерий, влияние обработки ими растений картофеля на устойчивость к фитопатогенным вирусам.

Материалы и методы

Для проведения экспериментов использованы штаммы бактерий *B. subtilis* 26Д, *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* В-5689, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* В-6066, любезно предоставленные для исследований ООО Научно-внедренческим предприятием «Башинком». Эндофитность бактерий была установлена ранее [10, 11]. Бактерии культивировали на среде Luria-Bertani (LB) в термостате ES-20 (Biosan, Латвия) при 25–27 °С. Для оценки влияния бактерий на антивирусную активность и урожайность картофеля использовали суточные культуры.

Внеклеточную РНКазную активность бактерий определяли согласно методике [12]. Для этого штаммы выращивали на среде LB с добавлением дрожжевой РНК (6 г/л) (Sigma, США) при 30 °С. Через 48 ч чашки Петри заливали 3 мл раствора 1М хлорной кислоты и выдерживали в течение 5 мин для осаждения РНК. При отсутствии РНКаз среда становилась молочно-белой, а при наличии вокруг колонии формировался прозрачный ореол (гало).

Активность внеклеточной РНКазы в культуральном фильтрате оценивалась согласно методике [13]. Для этого штаммы выращивали 48 ч на жидкой среде LB с добавлением дрожжевой РНК при 30 °С. Активность РНКаз в культуральном фильтрате после центрифугирования оценивали спектрофотометрически по поглощению при длине волны 260 нм, обусловленному гидролизом высокополимерной РНК и увеличением количества растворённых нуклеотидов.

Отбор растительного материала проводили на посадках картофеля раннеспелого сорта

Удача Бирской опытной станции Башкирского НИИ сельского хозяйства – обособленного структурного подразделения Уфимского федерального исследовательского центра РАН (БНИИСХ УФИЦ РАН) и посадках картофеля среднераннего сорта Невский Центральной экспериментальной базы Татарского НИИ сельского хозяйства Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр РАН» (ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН). Подготовка почвы и технология выращивания картофеля – общепринятая для регионов [14]. Площадь делянок 50 м², размещение систематизированное, повторность трёхкратная [15]. Сроки обработки: 1) полные всходы – до бутонизации; 2) бутонизация–цветение. Варианты обработок в условиях ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН: 1) Контроль – вода 200 л/га; 2) *B. subtilis* 26Д (сухой препарат) – 3 кг/га в 200 л воды; 3) МИКС (в 1 г сухой крахмально-сахарозной смеси 0,5 млрд. жизнеспособных спор и клеток бактерий *B. subtilis* 26Д, 0,25 млрд – *B. thuringiensis* ssp. *thuringiensis* (ВКПМ В-5689) и 0,25 млрд – *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* (ВКПМ В-6066)) – 1 кг/га в 200 л воды. Варианты обработок в условиях БНИИСХ УФИЦ РАН: 1) контроль – вода, 200 л/га; 2) обработка бактериями *B. subtilis* 26Д – 2 л/га препарата (титр клеток 1 млрд/мл) в 200 л воды; 3) обработка бактериями *B. thuringiensis* В-5689 – 2 л/га препарата (титр клеток 1 млрд/мл) в 200 л воды.

Оценку распространения тлей и поражение растений вирусами в поле проводили согласно [16]. Диагностику вирусов картофеля Y (YBK), S (SBK) и M (MBK) проводили методом иммуноферментного анализа. Статистическую обработку результатов проводили с оценкой точного критерия Фишера [17].

Результаты и обсуждение

Обработка растений картофеля препаратом, содержащим только клетки *B. subtilis* 26Д – основу биофунгицида Фитоспорин-М, привела к уменьшению поражения растений MBK (табл. 1). При обработке смесью штаммов бактерий статистически достоверно уменьшилось распространение YBK и SBK на 57 и 44%, соответственно, но распространённость MBK не изменилась по сравнению с контролем.

Сходным образом обработка растений картофеля уменьшала степень распространения вирусов в условиях БНИИСХ УФИЦ РАН. Так, если на контрольных делянках было поражено 60% растений, то при обработке препа-

Таблица 1 / Table 1
Поражение растений картофеля вирусами (%) / The lesion of potato plants by viruses (%)

Вариант / Variant	Вирус картофеля / Potato virus		
	YBK	SBK	MBK
Контроль / Control	50,4±4,3	33,6±4,0	5,8±2,0
<i>B. subtilis</i> 26Д / <i>B. subtilis</i> 26D	47,9±5,9	43,7±5,9	1,4±1,4
МИКС / MIX	21,7±5,0*	18,8±4,7*	5,8±2,8

Примечание: * Различия с контрольными растениями статистически значимы ($p < 0,05$).
Note: * Differences compared with control plants are statistically significant ($p < 0.05$).

Таблица 2 / Table 2
Влияние эндофитных штаммов рода *Bacillus* на распространённость тлей на посадках картофеля и поражённость растений насекомыми (%) / The influence of endophytic *Bacillus* strains on the prevalence of aphids in potatoes field and on the damage of plants by insects (%)

Показатель / Index	Вариант / Variant			
	контроль control	<i>B. subtilis</i> 26Д <i>B. subtilis</i> 26D	<i>B. thuringiensis</i>	
			ВКПМ-5689 / VKPM-5689	ВКПМ-6066 VKPM-6066
Распространённость / Prevalence	25,6	14,8	12,2	17,9
Поражённость растений Damaged plants	6,5	3,5	3,1	4,3

ратом бактерий *B. subtilis* 26Д выявлено 18% больных растений, бактериями *B. thuringiensis* В-5689 – 33%.

Очевидно, что наличие антивирусной активности препарата, содержащего три штамма бактерий (табл. 1), из которых два вида относятся к инсектотоксичным, могло проявиться благодаря подавлению распространённости насекомых переносчиков вирусов и, как следствие, уменьшению ими повреждения, в то время как антивирусную активность *B. subtilis* 26Д до данной работы невозможно было объяснить.

Кроме того, установлено, что обработка растений не только двумя штаммами известных по инсектотоксичности бактерий *B. thuringiensis* существенно уменьшала распространение тли – одного из известных переносчиков вирусов, но и обработка препаратом на основе бактерии *B. subtilis* 26Д, известной, в первую очередь, как основы биофунгицида (табл. 2) оказывала аналогичное инсектицидное действие.

Таким образом, одним из механизмов уменьшения распространения вирусов на растениях картофеля при обработке препаратами на основе изученных штаммов бактерий является их способность подавлять распространение тли на растениях.

На основе полученных данных можно предположить, что кроме инсектицидной активности бактерии могли оказывать негативный эффект и непосредственно на сами вирусные частицы. По имеющимся у нас данным,

прямых тестов на проявление антивирусной активности бактериями *in vitro* нет. Косвенно о способности бактерий оказывать влияние на вирусы можно судить по наличию активности РНКаз, полагая, что эти МО секретируют такие ферменты в среду и, тем самым, способны разрушать РНК вирусных частиц.

Действительно, нами впервые была выявлена способность исследованных штаммов секретировать в окружающую среду РНКазы (табл. 3). При этом все три штамма характеризовались примерно в равной степени такой активностью. Аналогичные результаты были получены и при оценке активности РНКазы в двухсуточном культуральном фильтрате. Таким образом, препарат МИКС характеризовался наличием инсектицидной и антивирусной активностей благодаря уменьшению распространения насекомых на посадках картофеля и, возможно, прямому антивирусному действию бактерий.

Известно, что многие бактерии, в особенности из рода *Bacillus*, способны продуцировать РНКазы, а также нуклеазы и другие белки, отвечающие за РНК-интерференцию [18]. Например, бактерии *B. amyloliquefaciens*, *B. intermedius* и *B. licheniformis* могут вырабатывать внеклеточные рибонуклеазы – барназы, биназы и балифазы, соответственно [19, 20]. Вероятно, этим можно объяснить способность сока из листьев табака, инфицированных клетками *Pseudomonas putida* АЗ, непосредственно разрушать частицы вируса табачной мозаики (ВТМ) [21, 22]. Обнаруже-

Сравнительная активность РНКазы бактерий
Comparative activity of bacteria RNase

Штамм / Strain	Размер гало, мм Halo size, mm	Активность РНКазы, ед./ (мин · мг белка) RNase activity, unit/ (min · mg protein)
<i>B. subtilis</i> 26Д / <i>B. subtilis</i> 26D	4,5	13,8±0,4
<i>B. thuringiensis</i> ВКПМ-6066 <i>B. thuringiensis</i> VKPM-6066	4,0	10,8±0,3
<i>B. thuringiensis</i> ВКПМ-5689 <i>B. thuringiensis</i> VKPM-5689	5,0	13,7±0,4

но, что барназы, кроме способности подавлять вирусную инфекцию, могут уменьшать развитие других болезней, например, фитофтороза, что доказано на трансгенных растениях табака, продуцирующих барназу [23]. Недавние исследования демонстрируют способность искусственных рибонуклеаз инактивировать РНК-содержащие вирусы посредством разрушения РНК и оболочки вирусных частиц [24]. Известно, что высокая устойчивость к патогенам наблюдается у трансгенных растений, экспрессирующих, например, нуклеазу *Serratia marcescens* [25]. Установлено, что бактерии штамма *B. cereus* ZH14 продуцируют новый тип секретируемой РНКазы, активной против вируса табачной мозаики [26]. У бактерий рода *Bacillus*, особенно *B. subtilis* и *B. thuringiensis*, чаще всего используемых в защите растений, секретируемые барназы и биназы известны как антивирусные и антираковые агенты [20].

В нашей работе впервые изучена способность описанных выше штаммов бацилл продуцировать внеклеточные РНКазы. Установлено, что, несмотря на принадлежность к разным видам и подвидам, бактерии продуцируют фермент(ы), примерно равные по активности, при культивировании как на твердой, так и жидкой питательной средах.

Заключение

Для эффективного подавления вирусных заболеваний необходимо постоянное присутствие противовирусных соединений непосредственно в тканях растений. Такой способностью могут обладать только эндофитные МО, продуцирующие РНКазы. Поэтому одним из подходов в защите растений от вирусной инфекции может быть использование эндофитных бактерий *Bacillus* spp., продуцирующих высокоактивные РНКазы, наряду со способностью проявлять инсектотоксичные и фунгицидные свойства. Однако данных об использовании такого подхода к созданию био-

препаратов с комплексом защитных свойств в научных публикациях не встречается. На основе проведенных исследований нами показана возможность применения такого подхода для повышения устойчивости растений картофеля к вирусам с помощью препаратов на основе изученных штаммов бактерий, способных ограничивать распространение насекомых-переносчиков вирусных частиц, а также оказывать прямой вирицидный эффект благодаря продукции РНКаз.

Работа выполнена в рамках совместного международного гранта РНФ и Департамента науки и техники (DST) правительства Индии № 19-46-02004. Энтомологические исследования (ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН) проводились в рамках Государственного задания Минобрнауки РФ № АААА-А18-118031390148-1.

References

1. Makarova S.S., Makarov V.V., Taliansky M.E., Kalinina N.O. Resistance to viruses of potato: current status and prospects // Russian Journal of Genetics: Applied Research V. 21. No. 1. P. 62–73 (in Russian). doi: 10.18699/VJ17.224
2. Nicaise V. Boosting innate immunity to sustainably control diseases in crops // Current Opinion in Virology. 2017. V. 26. P. 112–119. doi: 10.1016/j.coviro.2017.07.030
3. Dasgupta I., Malathi V.G., Mukherjee S.K. Genetic engineering for virus resistance // Current Science. 2003. V. 84 (3). P. 341–354.
4. Prins M., Laimer M., Noris E., Schubert J., Wasenegger M., Tepfer M. Strategies for anti-viral resistance in transgenic plants // Mol. Plant. Pathol. 2008. V. 9 (1). P. 73–83. doi: 10.1099/vir.0.80958-0
5. Whyard S., Singh A.D., Wong S. Ingested double-stranded RNase can act as species-specific insecticides // Insect Biochemistry and Mol. Biol. 2009. V. 39 (11). P. 824–832. doi: 10.1016/j.ibmb.2009.09.007
6. Huvenne H., Smaghe G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review // J. Insect. Physiol. 2010. V. 56 (3). P. 227–235. doi: 10.1016/j.jinsphys.2009.10.004

7. Whitten M.M.A., Facey P.D., Del Sol R., Fernández-Martínez L.T., Evans M.C., Mitchell J.J., Dyson P.J. Symbiont-mediated RNA interference in insects // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2016. V. 283 (1825). P. 20160042. doi: 10.1098/rspb.2016.0042
8. Desoignies N., Schramme F., Ongena M., Legrève A. Systemic resistance induced by *Bacillus* lipopeptides in *Beta vulgaris* reduces infection by the rhizomania disease vector *Polymyxa betae* // *Mol. Plant Pathol.* 2013. V. 14 (4). P. 416–421. doi: 10.1111/mp.12008
9. Sudhakar N., Thajuddin N., Murugesana K. Plant growth-promoting rhizobacterial mediated protection of tomato in the field against cucumber mosaic virus and its vector *Aphis gossypii* // *Biocontrol Science and Technology*. 2011. V. 21 (3). P. 367–386. doi: 10.1080/09583157.2011.552969
10. Burkhanova G.F., Veselova S.V., Sorokan' A.V., Blagova D.K., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. Strains of *Bacillus* ssp. regulate wheat resistance to *Septoria nodorum* Berk // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2017. V. 53. No. 3. P. 346–352. doi: 10.7868/S0555109917030047
11. Sorokan A.V., Benkovskaya G.V., Blagova D.K., Maksimova T.I., Maksimov I.V. Defense responses and changes in symbiotic gut microflora in the colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* under the effect of endophytic bacteria from the genus *Bacillus* // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2018. No. 4. P. 264–270 (in Russian). doi: 10.7868/S0044452918040063
12. Hole R.C., Singhal R.S., Melo J.S., D'Souza S.F. A rapid plate screening technique for extracellular ribonuclease producing strains // *BARC Newsletter*. 2004. No. 249. P. 91–96.
13. Margulis A.B., Sidiat O.V., Nikitina E.V., Kolpakov A.I., Ilinskaya O.N. Homoserine lactone as regulator of inducible and constitutive microorganisms enzymes // *Vestnik Kazanskogo Technologicheskogo Universiteta*. 2012. V. 15. No. 17. P. 173–176 (in Russian).
14. Zamalieva F.F., Salikhova Z.Z., Stashevskii Z., Safiullina G.F., Nazmieva R.R. Healthy potato seeds. Recommendations for growing. Kazan: Foliant, 2007. 60 p. (in Russian).
15. Dospikhov B.A. Methodology of field experience. Moskva: Agropromizdat, 1985. 351 p. (in Russian).
16. Research methodology for the protection of potatoes from diseases, pests, weeds and for plant immunity. Moskva: VNIKH, Rosselkhozakademiya, 1995. 65 p. (in Russian).
17. Rebrova O.Y. Statistical analyses of medical dates. Application of STATISTICA programs. Moskva: Media Sfera, 2002. 312 p. (in Russian).
18. Aguiar E.R.G.R., Olmo R.P., Marques J.T. Virus derived small RNAs: molecular footprints of host-pathogen interactions // *WIREs RNA*. 2016. No. 7. P. 824–837. doi: 10.1002/wrna.1361
19. Ulyanova V., Mahmud R.Sh., Dudkina E., Vershinina V., Domann E., Ilinskaya O. Phylogenetic distribution of extracellular guanyl-preferring ribonucleases renews taxonomic status of two *Bacillus* strains // *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2016. V. 62. P. 181–188. doi: 10.2323/jgam.2016.02.005
20. Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O. Barnase and binase: twins with distinct fates // *FEBS J.* 2011. V. 278. P. 3633–3643. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08294.x
21. Yang J., Guo C., Zhai X., Shen L., Qian Y., Wang F. Inactivation of tobacco mosaic virus in soil by *Pseudomonas putida* A3-m strain to prevent virus mosaic disease // *African J. Microbiol. Res.* 2012. V. 6. P. 6300–6307. doi: 10.5897/AJMR12.1123
22. Guo B., Lin J., Ye K. Structure of the autocatalytic cysteine protease domain of potyvirus helper-component proteinase // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286 (21). P. 937–943. doi: 10.1074/jbc.M111.230706
23. Natsoulis G., Boeke J.D. New antiviral strategy using capsid-nuclease fusion proteins // *Nature*. 1991. No. 352. P. 632–635. doi: 10.1038/352632a0
24. Fedorova A.A., Azzami K., Ryabchikova E.I., Spitsyna Y.E., Silnikov V.N., Ritter W., Gross H.J., Tautz J., Vlassov V.V., Beier H., Zenkova M.A. Inactivation of a non-enveloped RNA virus by artificial ribonucleases: honey bees and acute bee paralysis virus as a new experimental model for in vivo antiviral activity assessment // *Antiviral Research*. 2011. V. 91. P. 267–277. doi: 10.1016/j.antiviral.2011.06.011
25. Trifonova E.A., Komarova M.L., Leonova N.S., Shcherban' A.B., Kochetov A.V., Malinovskii V.I., Shumnyi V.K. Transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) plants expressing the gene of secretory nuclease from *Serratia marcescens* // *Doklady RAN*. 2004. V. 394. P. 39–41 (in Russian).
26. Zhou W.W., Niu T.G. Purification and some properties of an extracellular ribonuclease with antiviral activity against tobacco mosaic virus from *Bacillus cereus* // *Biotechnol. Lett.* 2009. V. 31. P. 101–105. doi: 10.1007/s10529-008-9831-1