

# МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ТОЛЕРАНТНОСТИ РАСТЕНИЙ К ВИРУСНЫМ ПАТОГЕНАМ: ИЗМЕНЕНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ПРОГРАММ ЭКСПРЕССИИ ФАКТОРОВ АУТОФАГИИ И RQC (RNA QUALITY CONTROL) В ПРОЦЕССЕ ПЕРСИСТЕНТНОЙ АЛЛЕКСИВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

MOLECULAR MECHANISMS ASSOCIATED WITH PLANT TOLERANCE TO VIRUS INFECTION: TRANSCRIPTIONAL REPROGRAMMING OF AUTOPHAGY AND RQC (RNA QUALITY CONTROL) FACTORS EXPRESSION DURING PERSISTENT ALLEXIVIRUS INFECTION

Архипов А.В., Вишниченко В.К.

ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии  
127550, Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42  
E-mail: vish@iab.ac.ru

Arkhipov A.V., Vishnichenko V.K.

All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology  
127550 Moscow, Russia  
E-mail: vish@iab.ac.ru

Толерантность к патогенам, включая вирусы, — одна из двух (наряду с резистентностью) основных форм иммунного ответа растений [1]. В отличие от резистентности, эта форма антивирусного иммунитета сопряжена со значительным снижением давления отбора в направлении возникновения новых, более вирулентных, вариантов вируса, более широким антивирусным спектром, фенотипической стабильностью и повышением способности растений адаптироваться к субоптимальным условиям окружающей среды [2]. Полученные нами ранее результаты [3,4] позволили предположить, что толерантная реакция растения на вирусную инфекцию может быть, в частности, обусловлена транскрипционным репрограммированием двух механизмов врожденной (innate) иммунной системы растения, а именно, аутофагии и RNA-decay. В соответствии с этой гипотезой, целью настоящей работы было исследование изменений транскрипционных программ экспрессии ключевых факторов аутофагии и RQC (RNA QUALITY CONTROL) в условиях толерантной реакции растения-хозяина на вирусную инфекцию. Работа проводилась в Лаборатории молекулярной вирусологии ВНИИСБ РАН на модели персистентной инфекции X вируса шалота (ХВШ) [5]. При проведении данной работы были решены следующие задачи: 1. Обнаружены и идентифицированы транскрипты, кодирующие комплекс факторов аутофагии и RNA-decay в растениях шалота; 2. Создана система специфических праймеров, позволяющих определять уровни представленности указанных транскриптов-мишеней методом полимеразной цепной реакции в реальном времени; 3. Определены уровни представленности транскриптов, кодирующих факторы аутофагии и RQC на разных этапах персистентной вирусной инфекции шалота. Результаты, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о том, что толерантная реакция растений шалота в условиях персистентной вирусной инфекции специфическим образом сопряжена с изменениями транскрипционных программ экспрессии базовых факторов аутофагии и RQC. Дальнейшие исследования молекулярных механизмов, обуславливающих состояние толерантности растений к вирусной инфекции, позволят выяснить, как эти процессы могут быть перепрограммированы с целью конструирования форм с.-х. растений, находящихся во взаимовыгодных симбиотических отношениях с инфицирующими их вирусами [20].

**Ключевые слова:** аллеливирусы, X вирус шалота, Allium cepa L. var. aggregatum L.G. Don, персистентная инфекция, толерантность, врожденная и адаптивная иммунные системы растений, PTI (Pattern-triggered immunity), ETI (effector-triggered immunity), РНК-сайленсинг, аутофагия, RNA-decay, транскрипционное репрограммирование.

**Для цитирования:** Архипов А.В., Вишниченко В.К. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ТОЛЕРАНТНОСТИ РАСТЕНИЙ К ВИРУСНЫМ ПАТОГЕНАМ: ИЗМЕНЕНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ПРОГРАММ ЭКСПРЕССИИ ФАКТОРОВ АУТОФАГИИ И RQC (RNA QUALITY CONTROL) В ПРОЦЕССЕ ПЕРСИСТЕНТНОЙ АЛЛЕКСИВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ. Аграрная наука. 2019; (2): 50–56.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2019-326-2-50-56>

*The two major mechanisms of plant defense against pathogens including viruses are resistance (the host's ability to limit pathogen multiplication) and tolerance (the host's ability to reduce the effect of infection on its fitness regardless of the level of pathogen multiplication) [1]. Tolerance is evolutionary more stable defense response and is effected against a larger spectrum of virus isolates compared to resistance; the selection pressure for emergence of virulent strains is also reduced in tolerant cultivars compared to resistant one, and persistent virus infection can improve the plant resilience in sub-optimal environmental conditions [2]. On the basis of our preliminary results [3, 4] we hypothesized that the plant tolerant reaction against virus infection may be in particular the consequence of transcriptomic reprogramming of autophagy and RNA-decay, the key processes of innate plant immunity. So, the task of this study is the experimental verification of this hypothesis by quantitative real-time PCR ascertainment of the autophagy and ROC (RNA quantity control) factors expression changes during persistent shallot virus X infection [5]. The research has been conducted at Molecular Virology Laboratory and Center of collective sharing of the All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology. In this context the autophagy and RNA-decay factors coding transcripts have been identified and their representation levels were determined in shallot plants. It was drawn a conclusion that persistent Shallot virus infection correlates with the specific autophagy and ROC factors expression changes. Further research on the molecular mechanisms associated with tolerance may identify novel targets for engineering tolerance to improve agriculture practices.*

**Key words:** allexiviruses, shallot virus X, Allium cepa L. var. aggregatum L.G. Don, persistent infection, tolerance, innate & adaptive immune systems, PTI (Pattern-triggered immunity), ETI (effector-triggered immunity), RNA-silencing, autophagy, RNA-decay, transcriptomic reprogramming.

**For citation:** Arkhipov A.V., Vishnichenko V.K. MOLECULAR MECHANISMS ASSOCIATED WITH PLANT TOLERANCE TO VIRUS INFECTION: TRANSCRIPTIONAL REPROGRAMMING OF AUTOPHAGY AND RQC (RNA QUALITY CONTROL) FACTORS EXPRESSION DURING PERSISTENT ALLEXIVIRUS INFECTION. Agrarian science. 2019; (2): 50–56. (In Russ.)

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2019-326-2-50-56>

## 1. Введение

Иммунный ответ растения на вирусную инфекцию базируется на функционировании как врожденной (innate), так и адаптивной (РНК-сайленсинг) иммунных систем хозяина. Это обеспечивает реализацию двух основных стратегических форм антивирусного иммунитета, а именно, резистентность, т.е. способность растения-хозяина ограничивать уровень репродукции вируса, и толерантность, ситуацию, при которой, несмотря на постоянное присутствие вируса в достаточно высокой концентрации, симптомы инфекции выражены либо очень слабо, либо полностью исчезают в процессе «гесовеги»; при этом в присутствии вируса, все базовые физиологические параметры растения, связанные с ростом, продуктивностью и репродуктивной функцией, поддерживаются в пределах нормы. Конфликт интересов растения-хозяина и вируса — движущая сила их коэволюции, и в самой общей форме феномен толерантности можно рассматривать как достижение состояния компромисса, или равновесия, между действием комплекса антивирусных иммунных реакций растения-хозяина и вирусными механизмами, направленными на преодоление иммунной реакции хозяина [2].

Активация врожденной иммунной системы растения осуществляется при участии комплекса различных клеточных рецепторов и ко-рецепторов [6], взаимодействующих с чужеродными иммуногенными лигандами и сигнализирующих таким образом об инвазии патогена. На разных этапах развития молекулярной фитопатологии рецепторная стадия функционирования врожденной иммунной системы описывалась с помощью различных концептуальных моделей [7] однако рассмотрение в едином контексте взаимодействия клеточных рецепторов как с консервативными микробными лигандами, так и с продуктами экспрессии Avr генов, «эффекторами» в современной интерпретации, удалось осуществить лишь в рамках так называемой zigzag-модели (ZM) [8], которая постулирует существование двухуровневой системы детекции патогена — PTI (pattern triggered immunity) и ETI (effector triggered immunity) — двух отдельных комплексов реакций растения в ответ на PAMPs (консервативные молекулярные структуры) и эффекторы патогена. При этом, несмотря на очевидный факт наличия у растений эффективных механизмов антивирусного иммунитета, логика ZM входит в противоречие с особенностями процесса репродукции фитовирусов и не позволяет включить вирусные инфекции в контекст данной модели. Недавно, однако, концептуальные основы ZM были подвергнуты всестороннему критическому анализу, и была предложена альтернативная модель [9], преодолевающая дихотомию PTI/ETI, объединяя и PAMPs, и эффекторы в континуум «инвазионных паттернов» (IP), что позволяет включить в число рассматриваемых в контексте этой модели биотрофных патогенов также и фитовирусы.

Отчетливо выраженным следствием индуцированных PTI/ETI сигнальных реакций в растениях является интенсивный процесс транскрипционного репрограммирования [10]. В ряде лабораторий было показано, что в случае острой вирусной инфекции растений выявляются сотни «дифференциально экспрессирующихся генов» с измененными, по сравнению с безвирусным контролем, уровнями транскрипции [11]. В то же время информация о транскрипционном репрограммировании в растениях в условиях персистентной вирусной инфекции весьма ограничена, хотя этот тип вирусных

инфекций растений представляет особый интерес, поскольку позволяет детально исследовать такие явления, как толерантность к вирусной инфекции и, в частности, процесс «гесовеги» [12,13]. Ранее мы показали [3,4], что персистентная инфекция X вируса шалота [5] сопряжена с подавлением экспрессии всех факторов РНК-сайленсинга и некоторых R-генов. С другой стороны, в этих работах была выявлена группа генов (NBR1, ARM, RRP41 и RRP43), уровень экспрессии которых в исследуемой патосистеме был существенно выше, нежели в безвирусных растениях; эти гены кодируют белки, которые при острой вирусной инфекции принимают участие в процессах антивирусной ксенофагии [14] и RNA-decay [15]. Это позволило нам предположить, что персистентная вирусная инфекция также может индуцировать в растениях шалота процессы аутофагии [16] и те или иные механизмы RQC (RNA Quality Control) [17]. Целью настоящей работы было исследование изменений транскрипционных программ экспрессии ключевых факторов аутофагии и RQC в условиях толерантной реакции растения-хозяина на вирусную инфекцию.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Растительный материал

Растения шалота (*Allium cepa* L. var. *aggregatum* L.G. Don) размножали луковицами в условиях персистентной инфекции ХВШ [5]. В настоящей работе термин «персистентная инфекция» используется в классическом значении, в каком он применяется при описании вирусных инфекций животных; в отношении вирусов растений этот термин в первом приближении соответствует понятию «chronic lifestyle» [18]. В каждом эксперименте высаживали 5–6 луковиц одного кластера побегов, и объединенные образцы корней, проростков и листьев отбирали через 5, 15, 25, 35 и 50 дней после высадки луковиц.

2.2. Получение препаратов суммарной РНК и детекцию вируса методом ПЦР в классическом варианте осуществляли, как описано нами ранее [3].

2.3. Поиск нуклеотидных последовательностей, кодирующих гомологи выбранных генов-мишеней, в транскриптом наиболее близкого к шалоту вида *A. cepa* L. проводили с использованием программы *tblastn* и базы данных TSA (Transcriptome Shotgun Assembly, NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/tsa/>)). Соответствие обнаруженных транскриптов искомым белкам-гомологам устанавливали с помощью программы *blastx*.

### 2.4. Дизайн и отбор праймеров.

При конструировании праймеров, специфичных в отношении шалотных гомологов исследуемых генов-мишеней был применен подход, использованный нами ранее [3,4]; набор праймеров генерировали с помощью программы *Primer3 v.4.1.0*. Выбор оптимальных праймеров осуществляли методом полимеразной цепной реакции по конечной точке. Синтез кДНК осуществляли с использованием набора реактивов производства СИНТОЛ (Россия) при следующем термальном цикле: 1) 25 °C 10 минут; 2) 37 °C 60 минут; 3) 85 °C 5 минут; амплификатор MJ Mini (BIORAD). Реакционная смесь общим объемом 25 мкл содержала: 2,5 мкл 10-ти кратного реакционного буфера, 5 мкл смеси dNTP (в концентрации 2,5 mM), 5 мкл смеси MgCl<sub>2</sub> (в концентрации 25 mM), 6,5 мкл дистиллированной воды, 1 мкл праймера Random-6, 2 мкл ингибитора рибонуклеаз (IRNase), 1 мкл ревертазы (MMLVplus), 2 мкл тотальной РНК.

## 2.5. Электрофорез в агарозном геле.

Электрофорез продуктов амплификации проводили в 1%-ном агарозном геле на основе 0,5 кратного TBE-буфера при напряжении электрического поля в 120В. Маркер M25 (SibEnzyme, Россия) размерностью 100–3000 пар нуклеотидов. Визуализацию результатов проводили на приборе LKB 2011 MACROVUE Transilluminator 130V.

## 2.6. Определения уровней представленности транскриптов.

Уровни представленности транскриптов, кодирующих белки-мишени в исследуемых образцах, определяли методом ПЦР в реальном времени в формате Comparative CT Experiment; алгоритм delta-delta CT; калибратор — безвирусные сеянцы шалота; нормалайзер — 18S РНК, что в условиях наблюдаемого динамического процесса транскрипционного репрограммирования представляется оптимальным выбором; амплификатор: The 7500/7500 Fast Real-Time PCR Systems или QuantStudio («Applied Biosystems», США); набор реагентов SYBR® Green Reagents (ОАО «Синтол», Москва). Определение проводили при трехкратной биологической и четырехкратной технической повторностях. Расчеты степеней экспрессии генов-мишеней, статистическую обработку результатов и построение гистограмм осуществляли с использованием встроенного программного обеспечения «Design & Analysis Software v 1.4.3». На рисунках в логарифмической форме представлены средние значения RQ (Relative Quantity).

## 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Индукция факторов аутофагии в условиях толерантной реакции растений шалота на вирусную инфекцию.

Процессы аутофагии, включая прямое связывание вирионов и (или) их компонентов, внутриклеточный транспорт этих комплексов и их деградация в лизосомах играют первостепенную роль в развитии антивирусного иммунного ответа в животных системах. В то же время функции аутофагии в антивирусном иммунитете растений изучены совершенно недостаточно. При этом уже имеющиеся результаты [19] свидетельствуют о том, что выяснение механизмов транскрипционного контроля аутофагии представляет одно из перспективных направлений исследований в этой области. В настоящей работе мы исследовали индукцию факторов аутофагии в условиях персистентной аллеловирусной инфекции как модели толерантного типа взаимодействия вируса с растением-хозяином. В таблице 1 представлены: А. гены-мишени; В. соответствующие белки — факторы аутофагии; С. ID нуклеотидных последовательностей в транскриптом А. сера, кодирующих гомологи факторов аутофагии; D и E. обозначения и нуклеотидные последовательности праймеров, с помощью которых определяли уровни представленности этих транскриптов в инфицированных растениях шалота.

Как следует из данных, представленных на рис. 1, наиболее выраженный результат изменения транскрип-

Таблица 1.

Факторы аутофагии и праймеры для их детекции в растениях шалота методом ПЦР в реальном времени

| А<br>Гены-мишени | В<br>Кодируемый белок                             | С<br>ID транскрипта А. сера TSA<br>NCBI | Д<br>Праймеры                  | Е<br>Структура праймеров                                   |
|------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------------------------|
| VPS15            | Vacuolar protein sorting-associated protein 15    | Не выявлены                             |                                |                                                            |
| ATG 2            | Autophagy related protein 2                       | GBJZ01171052.1                          | ATG 2–L–5941<br>ATG 2–R–6167   | 5'-CTGACGACAACTGTTACCCG-3'<br>5'-GAACGTGGAATCGGGGAAG-3'    |
| ATG 3            | Autophagy related protein 3                       | GFAK01032324.1                          | ATG 3–L–168<br>ATG 3–R–416     | 5'-TGGAAGAATGACTGGGCCT-3'<br>5'-TTTCTCCTCCTGCAGCTTCA-3'    |
| ATG 4            | Autophagy related protein 4                       | GBRQ01109808.1                          | ATG 4–L–617<br>ATG 4–R–814     | 5'-GTGATGTTGGATGGGGATGC-3'<br>5'-GTTGCCAGCTTGACAAA-3'      |
| ATG 5            | Autophagy related protein 5                       | GBRN01043093.1                          | ATG 5–L–104<br>ATG 5–R–315     | 5'-CACTACTCTTCCTCCTCCGC-3'<br>5'-AGGGTCTTTCAGTTCTGCA-3'    |
| ATG 6            | Autophagy related protein 6 (Beclin1)             | GETF01033334.1                          | ATG 6–L–324<br>ATG 6–R–481     | 5'-CGTGTACCTCATGACGCTG-3'<br>5'-CCTGTGTTGGGAGGTAGCT-3'     |
| ATG 8a           | Autophagy related protein 8a                      | GETF01010403.1                          | ATG 8a–L–116<br>ATG 8a–R–279   | 5'-GGAGCGACATACCTGACATTG-3'<br>5'-AGACATCATGGCAGCTGTTG-3'  |
| ATG 9            | Autophagy related protein 9                       | GBRO01033586.1                          | ATG 9–L–2592<br>ATG 9–R–2820   | 5'-CTTCTCTTTTGGGCAGCAG-3'<br>5'-AATAGCCCACTCCCTTGACC-3'    |
| PI3K             | Phosphatidylinositol 3-kinase                     | GETF01037631.1                          | PI3K –L–2105<br>PI3K –R–2272   | 5'-CAAAACCCTTCCACCACCC-3'<br>5'-AGCCCGCCATCAAGAAAAG-3'     |
| UBQ11            | Убиквитин                                         | JR850432.1                              | UBQ11–L–290<br>UBQ11–R–545     | 5'-TACTGCAACCACCACGAAGA-3'<br>5'-GTTCTGAGGCTTAGGGGAGG-3'   |
| NBR1             | Карго-рецептор в селективной аутофагии            | GBRN01003325.1                          | NBR1–L–2239<br>NBR1–R–2430     | 5'-TTCAGATGCGCTTCTTAACA-3'<br>5'-AGAGGGTCCCATTGACAAA-3'    |
| TRIM41           | tripartite motif-binding protein 41               | GBRN01073137.1                          | TRIM41–L–591<br>TRIM41–R–807   | 5'-TGCAGCTCAAACACAAACGA-3'<br>5'-ACTCCCACTTTCATTGCTTTGT-3' |
| TRIM5α           | tripartite motif-binding protein 5α               | GBGJ01000326.1                          | TRIM5α –L–222<br>TRIM5α –R–376 | 5'-GTTTGACCTTGTCTGCCCT-3'<br>5'-TTTTGTACGACAGTTGGGGC-3'    |
| MAPK             | stress-activated mitogen-activated protein kinase | GETF01030019.1                          | MAPK –L–710<br>MAPK –R–946     | 5'-CGGCAATTGATGCTGTGTC-3'<br>5'-TAGCTGCTGTTGGACATGA-3'     |

Таблица 2.

Детекция факторов RQC в растениях шалота: список праймеров для ПЦР в реальном времени

| Ген   | Функция кодируемого белка                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | ID транскриптов A. сера TSA NCBI | Праймер      | Последовательность          |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|--------------|-----------------------------|
| RRP41 | 3'-5'-exoribonuclease. Involved in 3'-5'-exoribonuclease activity, RNA binding; RNA processing                                                                                                                                                                                                                            | GAAN01015296.1                   | RRP41-L-222  | 5'-CACTGCAGTTCCACATCAC-3'   |
|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                  | RRP41-R-413  | 5'-CCTAAGAAAAGCCGGTCTGC-3'  |
| RRP42 | exosome complex RNA-binding protein                                                                                                                                                                                                                                                                                       | GAAO01016674.1                   | RRP42-L-336  | 5'-GAGCTCTCTTCATCCCCGACA-3' |
|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                  | RRP42-R-509  | 5'-GAAAGATCAAGCCCAGCACC-3'  |
| RRP43 | exosome non-catalytic core subunit. Involved in 3'-5' RNA processing and degradation in both the nucleus and the cytoplasm.                                                                                                                                                                                               | GAAN01010365.1                   | RRP43-L-976  | 5'-GCTCATAAAAGGGAAGCGGG-3'  |
|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                  | RRP43-R-1184 | 5'-CATCATCGGCTCATCCTTGC-3'  |
| RRP40 | Ribosomal RNA processing Exosome complex exonuclease. The exosome plays a central role in 3' to 5' RNA processing and degradation.                                                                                                                                                                                        | GETF01022424.1                   | RRP40-L-315  | 5'-GCCCGTACTTGCATTGAG-3'    |
|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                  | RRP40-R-542  | 5'-ACTGGACATGTTGGTGAGCT-3'  |
| RRP6  | exosome complex exonuclease                                                                                                                                                                                                                                                                                               | GFAK01071797.1                   | RRP6-L-50    | 5'-GAAAGCTCGATCTCATGGCG-3'  |
|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                  | RRP6-R-235   | 5'-TCCGACAAAGATCCATGCCT-3'  |
| CSL4  | complex RNA-binding protein                                                                                                                                                                                                                                                                                               | GBRQ01072570.1                   | CSL4-L-740   | 5'-CTTTGCCAGCGATGATTGC-3'   |
|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                  | CSL4-R-969   | 5'-TCGCTCTCTGTTGGACCAAT-3'  |
| DCP1  | mRNA decapping protein                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | GAAN01021809.1                   | DCP1-L-713   | 5'-ACCAGCACCTTCTTACCCAA-3'  |
|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                  | DCP1-R-867   | 5'-TAACAAGTTCTGTCGCATGG-3'  |
| DCP2  | mRNA decapping protein                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | GETF01027086                     | DCP2-L-741   | 5'-CCATCCTCCTCCAGTAGCTC-3'  |
|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                  | DCP2-R-970   | 5'-AGTTGGCAGCAAAAGCAGTT-3'  |
| SGS3  | Suppressor of gene silencing 3 Including: XS zinc finger domain; XS domain; TATA Binding Protein (TBP) Associated Factor 12 (TAF12) is one of several TAFs that bind TBP and is involved in forming Transcription Factor IID (TFIID) complex Required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance | GETF01032354.1                   | SGS3-L-241   | 5'-ACAAGGGGAACACGAAGAGT-3'  |
|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                  | SGS3-R-414   | 5'-AACCATCACCATAGGAGGCC-3'  |
| XRN3  | 5'-3' exoribonuclease 3. XRN3 acts as a suppressor of posttranscriptional gene silencing/ Involved in mRNA processing; miRNA catabolic process; negative regulation of posttranscriptional gene silencing; nuclear polyadenylation-dependent rRNA catabolic process; rRNA 5'-end processing.                              | GFAK01072575.1                   | XRN3-L-3050  | 5'-CTGTAGCTGGGCCGTATGTA-3'  |
|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                  | XRN3-R-3249  | 5'-GCCACGATTGATCCACCTC-3'   |
| XRN4  | 5'-3' exoribonuclease 4. Involved in the ethylene response. Endogenous suppressor of posttranscriptional gene silencing.                                                                                                                                                                                                  | GBRN01015228.1                   | XRN4-L-2182  | 5'-TCCTCGCCGTCATCAACATA-3'  |
|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                  | XRN4-R-2367  | 5'-TGTGATGCTTCGCCTAGGAT-3'  |
| UPF1  | Regulator of nonsense transcripts                                                                                                                                                                                                                                                                                         | GBRQ01034547.1                   | UPF1-L-308   | 5'-ATTTCCACCTTTCCAGT-3'     |
|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                  | UPF1-R-510   | 5'-ACTCAGATCCATCGTCCGTC-3'  |

ционных программ экспрессии факторов аутофагии в исследуемой системе — существенное увеличение экспрессии Atg8a и карго-рецептора NBR1, ключевых факторов формирования аутофагосом.

**3.2. Индукция факторов RQC (RNA Quality Control) в условиях толерантной реакции растений шалота на вирусную инфекцию.**

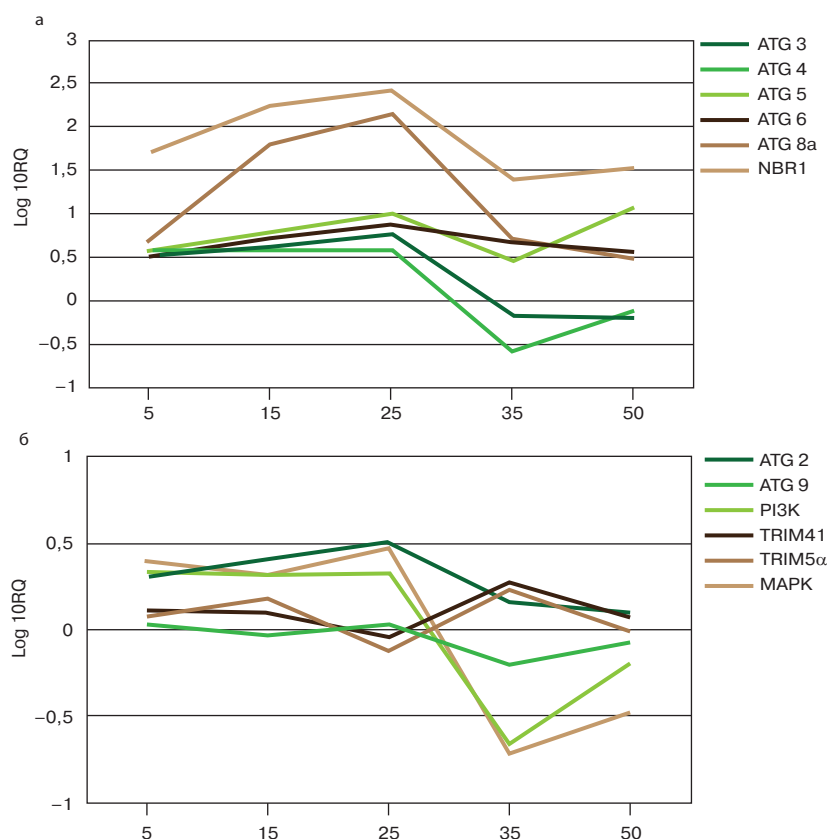
В растениях РНК-сайленсинг и RNA-decay являются ключевыми процессами, осуществляющими количественный и качественный контроль пула клеточных информационных РНК. Возникновение структурно или функционально дефектных молекул мРНК индуцирует процесс посттранскрипционного РНК-сайленсинга; в то же время подобные молекулы распознаются и уничтожаются при участии сложного комплекса механизмов RQC. Поскольку вирусные РНК обладают рядом необычных, с точки зрения клетки, структурных особенностей, эти молекулы также атакуются механизмами RNA-decay, представляющими, т.о., мощный фактор антивирусного иммунитета.

В настоящей работе исследованы изменения транскрипционных программ экспрессии ключевых факторов RQC в условиях толерантной реакции растений шалота на вирусную инфекцию.

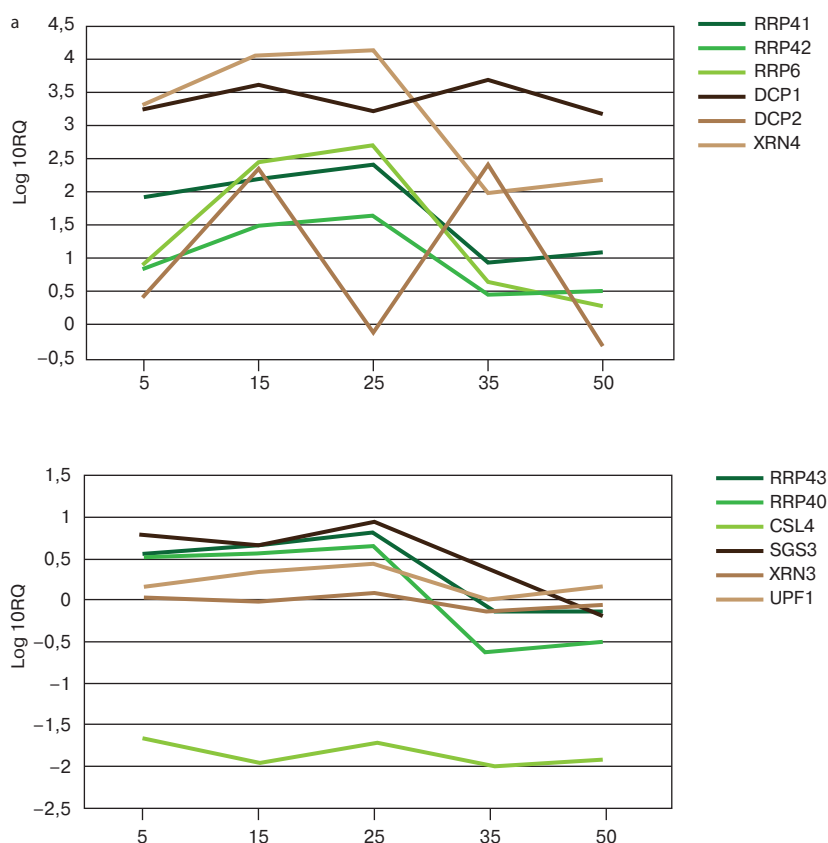
В таблице 2 представлены исследуемые в работе гены-мишени, кодирующие факторы RQC, соответствующие белки, нуклеотидные последовательности, кодирующие гомологи этих генов в транскриптоме A. сера и праймеры, с помощью которых определяли уровни представленности этих транскриптов в инфицированных растениях шалота. На рисунке 2 представлены относительные уровни экспрессии факторов RQC в листьях инфицированных растений шалота.

Как следует из представленных данных, в исследуемой системе наблюдается существенное увеличение уровней экспрессии декэпирующего фактора DCP1 и XRN4 — 5' — 3' — экзорибонуклеазы, — фактора, принимающего участие в реализации нескольких механизмов RNA-decay. Необходимо отметить также, что XRN4 представляет собой мощный эндогенный супрессор РНК-сайленсинга; при этом в листьях (но не в корнях)

**Рис. 1.** Относительные уровни экспрессии факторов аутофагии в листьях инфицированных растений шалота: а — NBR1, ATG 2–6, 8a; б — ATG2 & 9, PI3K, TRIM41 & 5α, MAPK. На оси абсцисс указаны дни после высадки луковиц. RQ: Relative Quantity



**Рис. 2.** Относительные уровни экспрессии факторов RQC в листьях инфицированных растений шалота: а — RRP 6, 41, 42, DCP 1 & 2, XRN4; б — RRP 40 & 43, CSL4, SGS3, XRN3, UPF1. На оси абсцисс указаны дни после высадки луковиц. RQ: Relative Quantity



экспрессия классического эндогенного супрессора сайленсинга — SGS3 — после незначительного повышения существенно подавляется; одновременно и в листьях, и в корнях наблюдается резкое подавление экспрессии CSL4 — 3'-5'-экзорибонуклеазы; в цитоплазме этот фактор участвует в процессе специфической деградации молекул мРНК, содержащих AREs (AU-rich elements) в составе 3'-нетранслируемой последовательности.

### 3.3. UPF-1 интерактом в условиях персистентной аллелксивиральной инфекции.

UPF-1- РНК-хеликазный комплекс (UPF-1 интерактом) участвует в реализации одного из механизмов RQC, а именно, nonsense-mediated decay (NMD); как следует из результатов, представленных в предыдущем разделе, вирусная инфекция лишь в незначительной степени влияет на уровень экспрессии собственно фактора UPF-1 в листьях растений шалота; логично было выяснить, как вирусная инфекция влияет на экспрессию других компонентов UPF-1 интерактома. В таблице 3 представлены исследуемые в работе гены-мишени, кодирующие элементы UPF-1 интерактома, соответствующие белки, нуклеотидные последовательности, кодирующие гомологи этих генов в транскриптоме А. сера и праймеры, с помощью которых определяли уровни представленности этих транскриптов в инфицированных растениях шалота. На рис. 3 представлены относительные уровни экспрессии элементов UPF-1 интерактома в листьях инфицированных растений шалота.

Как следует из представленных данных, в процессе персистентной вирусной инфекции характер экспрессии UPF-1-РНК-хеликазного комплекса (UPF-1 интерактома) каким бы то ни было координированным образом не изменяется; экспрессия большинства факторов этого комплекса, включая UPF-1, сохраняется на уровне контрольных растений, за исключением универсальных декэппирующих факторов DCP1 и DCP5, участвующих во всех процессах RQC. На основании представленных результатов сделан предварительный вывод, согласно которому в исследуемой патосистеме процесс nonsense-mediated decay (NMD) либо не принимает участия в распознавании и деградации вирусных РНК, либо его участие не требует увеличения уровней экспрессии элементов этого комплекса.

Таблица 3.

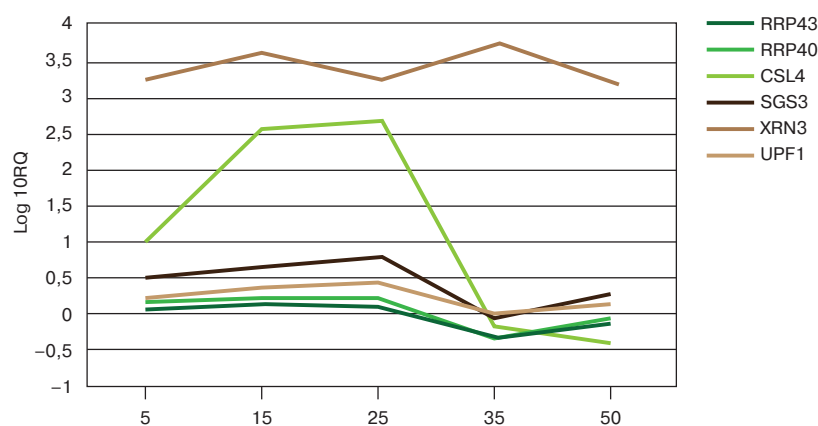
Детекция факторов UPF-1 интерактома в растениях шалота: список праймеров для ПЦР в реальном времени

| Ген          | Функция кодируемого белка                                                                                                                                                                      | ID транскриптов A. сера TSA NCBI | Праймер           | Последовательность          |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------|-----------------------------|
| UPF1         | Regulator of nonsense transcripts. Protein that is part of a post-splicing multiprotein complex involved in both mRNA nuclear export and mRNA surveillance [Arabidopsis thaliana] (OAO95801.1) | GBRQ01034547.1                   | UPF1-L-308        | 5'-ATTTCCACCCCTTCCAGT-3'    |
|              |                                                                                                                                                                                                |                                  | UPF1-R-510        | 5'-ACTCAGATCCATCGTCCGTC-3'  |
| DCP1         | mRNA-decapping enzyme-like protein [Ananas comosus] (XP_020088942.1)                                                                                                                           | GAAN01021809.1                   | DCP1-L-713        | 5'-ACCAGCACCTTCTTACCCAA-3'  |
|              |                                                                                                                                                                                                |                                  | DCP1-R-867        | 5'-TAACAAGGTTCTGTCGCATGG-3' |
| Endonuclease | Putative endonuclease or glycosyl hydrolase At2g15560 [Arabidopsis thaliana] (AAQ65184.1).                                                                                                     | GETF01030267.1                   | Endoase — L — 284 | 5'-CTCCTAGAATTGCGCAGGGT-3'  |
|              |                                                                                                                                                                                                |                                  | Endoase — R — 483 | 5'-CCCACGTTGCCCTAAACAT-3'   |
| TNTase       | nucleotidyltransferase AT3G61690 [Arabidopsis thaliana] (NP_001327686.1)                                                                                                                       | GBJZ01143004.1                   | TNTase — L — 555  | 5'-CCATCTCGACCCCTTCAGAA-3'  |
|              |                                                                                                                                                                                                |                                  | TNTase — R — 786  | 5'-TCCGATAACAGATCAGGCC-3'   |
| DCP5         | mRNA decapping protein 5 [Arabidopsis thaliana] (OAP16255.1).                                                                                                                                  | GETF01034933.1                   | DCP5 — L — 232    | 5'-CGGGGTAGTGACATCAAGGA-3'  |
|              |                                                                                                                                                                                                |                                  | DCP5 — R — 416    | 5'-AGTTGAGACGTGTGGGAAC-3'   |
| RH8          | probable ATP-dependent RNA helicase DDX6 [Homo sapiens] (NP_001244120.1)                                                                                                                       | GBJZ01034265.1                   | RH8 — L — 1896    | 5'-GAATGGGGTTGTTCTCTCGG-3'  |
|              |                                                                                                                                                                                                |                                  | RH8 — R — 2048    | 5'-AACCCAGTTCTTGTTCGA-3'    |

#### 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, представленные в настоящей работе результаты подтверждают сделанный нами ранее вывод [3], согласно которому в условиях персистентной инфекции X вирус шалота индуцирует в листьях инфицированных растений динамический процесс транскрипционного репрограммирования, т.е., избирательное изменение уровней экспрессии целого ряда генов-мишеней. При этом отмечается чрезвычайно высокий уровень экспрессии определенных генов, феномен, который не наблюдается при острых вирусных инфекциях. Ранее мы показали [4], что процесс транскрипционного репрограммирования касается генов, кодирующих белки-маркеры PTI, факторы РНК-сайленсинга, NB-LRR рецепторы, липид-трансферные белки, а также белки, принимающие участие в процессе репликации вируса. В настоящем исследовании показано, что в результате персистентной вирусной инфекции интенсивному транскрипционному репрограммированию подвергаются также гены, кодирующие различные факторы аутофагии и RQC. Полученные нами результаты позволяют предположить, что в условиях толерантной реакции растения на вирусную инфекцию изменения транскрипционных программ экспрессии факторов аутофагии, вероятно, направлены на оптимизацию уровня экспрессии вирусного капсидного белка, а модификация механизмов RQC направлена на 1) подавление

Рис. 3. Относительные уровни экспрессии компонентов UPF-1 интерактома в листьях инфицированных растений шалота. На оси абсцисс указаны дни после высадки луковиц. RQ: Relative Quantity



трансляции клеточных РНК (действие декэпирующих факторов); 2) на предотвращение деградации 3'-х концевых участков вирусных РНК (подавление экспрессии фактора CSL4) и 3) активацию эндогенных супрессоров РНК-сайленсинга (индукция XRN4). Вопрос об участии UPF-1 интерактома (процесс nonsense-mediated decay, NMD) в формировании состояния толерантности растений шалота к вирусной инфекции требует дополнительных исследований.

Работа выполнена в рамках научно-исследовательского проекта (Государственное задание № 0574-2019-001) «Исследование молекулярных механизмов супрессии РНК-сайленсинга вирусами растений (на модели вирусного комплекса шалота и вируса шарки сливы)».

## ЛИТЕРАТУРА

1. Pagan, I., and García-Arenal, F. \ Tolerance to Plant Pathogens: Theory and Experimental Evidence. \ Int J Mol Sci. — 2018 — 19(3): 810. doi:10.3390/ijms190308103.
2. Paudel D.B. and Sanfaçon H. \ Exploring the Diversity of Mechanisms Associated With Plant Tolerance to Virus Infection. \ Front. Plant Sci. — 2018. — 9:1575. doi: 10.3389/fpls.2018.01575
3. Arkhipov, A.V., Solovyev, A.G., Vishnichenko, V.K. \ Persistent Shallot virus X infection correlates with transcriptional repression of plant cell RNA-dependent RNA polymerase and DCL proteins in plant roots. \ Molecular Biology. — 2017. — 51(1):108–111. doi:10.7868/S0026898417010037
4. Arkhipov, A.V. Vishnichenko, V.K. \ Pattern-Triggered Immunity (PTI) induction and transcriptional reprogramming in persistent allexivirus infection. \ Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya — 2018 — 5(3): 947–957. doi: 10.15389/agrobiology.2018.5.947rus
5. Vishnichenko V.K., Konareva T.N., Zavriev S.K. \ A new filamentous virus in shallot. \ Plant. Pathol. — 1993. — 42: 121–126.
6. Calil IP, Fontes EPB \ Plant immunity against viruses: antiviral immune receptors in focus. \ Ann Bot. — 2017. — 119(5):711–723. doi: 10.1093/aob/mcw200.
7. Flor H.H. \ Current status of the gene-for-gene concept. \ Annu Rev Phytopathol. — 1971 — 9: 275–296. DOI:10.1146/annurev.py.09.090171.001423.
8. Jones JDG, Dangl J \ The plant immune system. \ Nature — 2006 — 444:323–29.
9. Cook DE, Mesarich CH, Thomma BP. \ Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. \ Annu Rev Phytopathol. — 2015 — 53:541–63. doi: 10.1146/annurev-phyto-080614–120114.
10. Birkenbihl RP, Liu S, Somssich IE. \ Transcriptional events defining plant immune responses. \ Curr Opin Plant Biol. — 2017 — 38:1–9. doi:10.1016/j.pbi.2017.04.004
11. Seo JK, Kim MK, Kwak HR, Choi HS, Nam M, Choe J, Choi B, Han SJ, Kang JH, Jung C. \ Molecular dissection of distinct symptoms induced by tomato chlorosis virus and tomato yellow leaf curl virus based on comparative transcriptome analysis. \ Virology. — 2018 — 516:1–20. doi: 10.1016/j.virol.2018.01.001.
12. Shukla A, Pagán I, García-Arenal F. \ Effective tolerance based on resource reallocation is a virus-specific defence in *Arabidopsis thaliana*. \ Mol Plant Pathol. — 2018. — 19(6):1454–1465. doi: 10.1111/mpp.12629.
13. Ghoshal, B., and Sanfaçon, H. \ Symptom recovery in virus-infected plants: revisiting the role of RNA silencing mechanisms. \ Virology — 2015. — 47: 167–179. doi: 10.1016/j.virol.2015.01.008
14. Hafren A, Hofius D \ NBR1-mediated antiviral xenophagy in plant immunity. \ Autophagy. — 2017 — 13(11):2000–2001. doi: 10.1080/15548627.2017.1339005.
15. Gabriela Conti, Diego Zavallo, Andrea L. Venturuzzi, Maria C. Rodriguez, Martin Crespi and Sebastian Asurmendi \ TMV induces RNA decay pathways to modulate gene silencing and disease symptoms. \ The Plant Journal — 2017 — 89: 73–84.
16. Hofius D, Li L, Hafren A, Coll NS \ Autophagy as an emerging arena for plant-pathogen interactions. \ Curr Opin Plant Biol. — 2017 — 38:117–123. doi: 10.1016/j.pbi.2017.04.017.
17. Chicois C, Scheer H, Garcia S, Zuber H, Mutterer J, Chicher J, Hammann P, Gagliardi D, Garcia D. \ The UPF1 interactome reveals interaction networks between RNA degradation and translation repression factors in *Arabidopsis*. \ Plant J. — 2018. doi: 10.1111/tpj.14022.
18. Roossinck MJ \ Lifestyles of plant viruses. \ Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. — 2010. — 365(1548):1899–905.
19. Tang J., Bassham D.C. \ Autophagy in crop plants: what's new beyond *Arabidopsis*? \ Open Biol. — 2018 — 8(12). pii: 180162. doi: 10.1098/rsob.180162.
20. Roossinck M.J., Bazán E.R. \ Symbiosis: Viruses as Intimate Partners. \ Annu Rev Virol. — 2017 — 4(1):123–139. doi: 10.1146/annurev-virology-110615–042323.