СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОЛОГИЯ, 2018, том 53, № 5, с. 947-957

Иммунитет и болезни растений

УДК 632.3:635.263:578.85/.86:578.2:577.217 doi: 10.15389/agrobiology.2018.5.947rus

ИНДУКЦИЯ PTI (PATTERN-TRIGGERED IMMUNITY) И ТРАНСКРИПЦИОННОЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ ПРИ ПЕРСИСТЕНТНОЙ АЛЛЕКСИВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ*

А.В. АРХИПОВ, В.К. ВИШНИЧЕНКО

Растения обладают сложной антивирусной иммунной системой, в функционировании которой ключевую роль играет РНК-сайленсинг — индуцибельный молекулярный механизм, контролирующий уровень репликации вируса и степень выраженности симптомов. В ряде случаев сайленсинг подавляется при действии вирусных белков-супрессоров, предотвращающих фрагментацию или блокирование трансляции вирусных РНК. Активность белков-супрессоров считают непременным условием успешной репродукции фитовирусов. В то же время РНК-сайленсинг нельзя рассматривать исключительно как беспощадный антивирусный механизм, действие которого необходимо полностью подавить, в действительности, по-видимому, происходит тонкая регуляция этого процесса. Известно, что многие фитовирусы кодируют супрессоры, обладающие очень слабой или преходящей активностью (transiently active suppressors). В частности Х вирус шалота (ХВШ), прототип рода *Allexivirus*, успешно репродуцируется и формирует персистентную инфекцию в отсутствие активного белка-супрессора и, следовательно, преодолевает иммунный барьер сайленсинга с помощью иного механизма. Основываясь на полученных в последние 2-3 года экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что фитовирусы (подобно бактериальным патогенам) индуцируют процесс, аналогичный классическому PTI (Pattern-triggered immunity), мы предположили, что таким механизмом может быть обусловленное PTI специфическое транскрипционное репрограммирование. Наши предварительные результаты свидетельствовали в пользу этой гипотезы (А.В. Архипов с соавт., 2017): инфекция ХВШ оказалась сопряженной с подавлением экспрессии по меньшей мере двух факторов сайленсинга (DCL-белков и RDR) в корнях и листьях инфицированных растений. Задачей настоящей работы была экспериментальная проверка предложенной нами гипотезы методом ПЦР в реальном времени с использованием более широкого спектра генов-мишеней, включающего 10 классических маркеров PTI и ряд генов, продукты экспрессии которых участвуют в репродукции фитовирусов (TCTP-комплекс). В работе впервые получены экспериментальные данные, свидетельствующие об индукции PTI в растениях шалота (*Allium cepa* L. var. *aggregatum* L.G. Don) в условиях персистентной вирусной инфекции и об участии этого механизма в транскрипционном репрограммировании; показано, что в результате в инфицированных растениях шалота подавляется экспрессия всех факторов сайленсинга и некоторых R-генов (например, гомологов гена $Tm2^2$, кодирующего белок, принадлежащий к классу NB-LRR рецепторов). Также нами выявлена группа генов, уровень экспрессии которых в исследуемой патосистеме существенно повышен по сравнению со здоровыми растениями: *SOBIR* — log10RQ ~ 1,0; *ARM* (гены, кодирующие белки armadillo) — log10RQ ~ 2,0; *PR1* — log10RQ ~ 2,0; *PR5* — log10RQ ~ 4,0 (!); Pathogenesis-related protein 14 = nsLTP — log10RQ ~ 2.0. Таким образом, Х вирус шалота индуцирует динамический и скоординированный процесс транскрипционного репрограммирования в корнях и листьях инфицированных растений; при этом подавление экспрессии всех факторов РНК-сайленсинга (особенно белков-аргонавтов) и ряда NB-LRR рецепторов, по-видимому, и обусловливает успешность формирования состояния персистентной вирусной инфекции. Одно из важнейших направлений дальнейших исследований молекулярных механизмов антивирусного фитоиммунитета — идентификация специфических антивирусных PRR (Pattern recognition receptors) растительной клетки и выяснение молекулярных механизмов взаимодействия этих рецепторов с репликативными (двуцепочечными) формами вирусных РНК (вирусными PAMPs): именно этот процесс определяет качественные и количественные параметры транскрипционного репрограммирования в растениях при вирусной инфекции. Клонирование и межвидовой перенос антивирусных PRR растительной клетки может оказаться перспективной технологией создания новых форм сельскохозяйственных растений, обладающих высокой и длительной резистентностью к широкому спектру вирусных патогенов (D. Bao с соавт., 2017).

Ключевые слова: аллексивирусы, Х вирус шалота, *Allium cepa* L. var. *aggregatum* L.G. Don, персистентная инфекция, РНК-сайленсинг, врожденная иммунная система растений, Pattern-triggered immunity (PTI), транскрипционное репрограммирование.

Растения обладают сложной защитной антивирусной системой, в

* Работа выполнена в рамках научно-исследовательского проекта «Исследование молекулярных механизмов супрессии РНК-сайленсинга вирусами растений (на модели вирусного комплекса шалота и вируса шарки сливы)» (Госзадание № 0574-2015-0003 на 2017 год).

процессе функционирования которой ключевую роль играет РНК-сайленсинг — индуцируемый вирусными двуцепочечными РНК молекулярный механизм, контролирующий уровень репликации вируса и степень выраженности симптомов (1, 2). При этом активность вирусных белков-супрессоров, предотвращающих фрагментацию или блокирование трансляции вирусных РНК в процессе сайленсинга, считают непременным условием успешной репродукции фитовирусов (3, 4). Известно, однако, что многие фитовирусы кодируют супрессоры, обладающие очень слабой или преходящей активностью (transiently active suppressors) (5). В частности, как мы показали ранее (6), Х вирус шалота (ХВШ) — прототип рода *Allexivirus* — вызывает персистентную инфекцию и успешно репродуцируется в отсутствие активного белка-супрессора, следовательно, преодолевает иммунный барьер сайленсинга с помощью иного механизма. Мы предположили, что таким механизмом может быть специфическое транскрипционное репрограммирование (ТРП) (7, 8), обусловленное PTI (Pattern-triggered immunity) — первой «линией обороны» врожденной иммунной системы растений (9); в результате ТРП может избирательно изменяться уровень экспрессии целого ряда генов-мишеней, участвующих в репродукции фитовирусов, и, в частности, подавляться до критического уровня экспрессия ключевых факторов РНК-сайленсинга: DCL-белков, белков-аргонавтов (Ago) и клеточных РНК-зависимых РНК-полимераз (RDR). Полученные нами ранее результаты свидетельствовали в пользу этого предположения: инфекция ХВШ оказалась сопряженной с подавлением транскрипции генов DCL-белков и RDR в корнях и листьях инфицированных растений (10).

В последние 2-3 года в нескольких зарубежных лабораториях были получены экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что фитовирусы подобно бактериальным патогенам индуцируют процесс, аналогичный классическому PTI (11-13); при этом индукторами (вирусными PAMPs) служат двуцепочечные репликативные формы вирусных РНК (12, 13). Таким образом, в растительной клетке функционируют по меньшей мере два антивирусных механизма, запускаемых при участии двуцепочечных РНК, — РНК-сайленсинг и PTI.

В классическом варианте PTI инициируется в результате специфического узнавания консервативных молекулярных структур (паттернов) патогена (PAMPs, Pathogen-associated molecular patterns), например флагеллина бактерий, клеточными рецепторами (PRRs, Pattern recognition receptors), представляющими собой RLKs (receptor-like kinases) или LRR-RKs (leucine-rich repeat receptor kinases) и локализованными на плазматической мембране растительной клетки (14-18). При взаимодействии молекулярных паттернов с PRRs наблюдается немедленная и интенсивная индукция транскрипционного репрограммирования, что выражается, в частности, в дифференциальной экспрессии ряда белков, служащих маркерами PTI (19). Специфические антивирусные PRR растительной клетки до настоящего времени не идентифицированы, хотя косвенно их существование достаточно убедительно подтверждается недавним исследованием роли полифункционального кошаперона Hop/Sti1 в симптоматике инфекции вируса Y картофеля (20).

В России это направление изучения молекулярных механизмов антивирусного фитоиммунитета пока не получило должного развития. В настоящей работе впервые в мировой литературе представлены экспериментальные данные, свидетельствующие об индукции PTI в растениях в условиях персистентной вирусной инфекции и об участии этого механизма в транскрипционном репрограммировании; показано, что в результате ТРП в инфицированных растениях шалота наблюдается подавление экс-

прессии всех факторов сайленсинга и некоторых R-генов (например, гомологов гена *Tm2*^{2}).

В представленной работе нами впервые получены экспериментальные данные, свидетельствующие об индукции PTI в растениях шалота в условиях персистентной вирусной инфекции и об участии этого механизма в транскрипционном репрограммировании.

Целью настоящего исследования была экспериментальная проверка нашей гипотезы (10) о ключевой роли транскрипционного репрограммирования как механизма супрессии РНК-сайленсинга, а также предположения, согласно которому транскрипционное репрограммирование сопряжено с PTI и в результате этого процесса могут избирательно изменяться уровни экспрессии ряда генов, участвующих в репродукции фитовирусов (например, TCTP-комплекс) (21).

Методика. Растения шалота (*Allium cepa* L. var. *aggregatum* L.G. Don) размножали луковицами в условиях персистентной инфекции ХВШ. В каждом эксперименте высаживали 5-6 луковиц одного кластера побегов, объединенные образцы корней, проростков и листьев отбирали через 3 сут и через 2 нед после высадки луковиц.

Получение препаратов суммарной РНК и детекцию вируса методом ПЦР в классическом варианте осуществляли, как описано нами ранее (10).

Поиск нуклеотидных последовательностей, кодирующих гомологи выбранных генов-мишеней, в транскриптоме наиболее близкого к шалоту вида *A. cepa* L. проводили с помощью программ tblastn, tblastx и базы данных TSA (Transcriptome Shotgun Assembly, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/tsa/). При конструировании праймеров, специфичных в отношении шалотных гомологов исследуемых генов-мишеней, был применен подход, использованный нами ранее (10, 23); набор праймеров генерировали с помощью программы Primer3 v.4.1.0 (http://primer3.ut.ee/).

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 (22). Амплификатор — 7500/7500 Fast Real-Time PCR Systems или QuantStudio («Applied Biosystems», США), набор реагентов SYBR® Green Reagents (ОАО «Синтол», Москва).

Определение проводили при 3-кратной биологической и 4-кратной технической повторностях. Расчеты степеней экспрессии генов-мишеней, статистическую обработку результатов и построение гистограмм осуществлялись автоматически посредством встроенного программного обеспечения Design & Analysis Software v.1.4.3 («Applied Biosystems», США). На рисунках представлены средние значения RQ (в логарифмической форме) и их отклонения (RQ_{min} и RQ_{max}).

Результаты. В таблице 1 приведены маркеры PTI, в таблице 2 — соответствующие праймеры. В первой серии экспериментов исследовали представленность транскриптов 10 классических маркеров PTI (рис. 1).

1. Гены-мишени, уровни экспрессии которых исследовали в настоящей работе в условиях персистентной инфекции шалота (*Allium cepa* L. var. *aggregatum*) Х вирусом шалота

Символ гена	Название белка — продукта экспрессии	Вид растения, ID ортолога	
	Гены-маркеры PTI		
ARM	Armadillo repeat family proteins	*Arabidopsis thaliana*	AT3G02840
RBOHD	Respiratory Burst Oxidase Homologue D	*Arabidopsis thaliana*	AT5G47910
EDS5	Mate Efflux Family Protein (Enhanced Disease Susceptibility 5)	*Arabidopsis thaliana*	AT4G39030

Продолжение таблицы 1

LOX3	Lipoxygenase 3	*Arabidopsis thaliana*	AT1G17420
BRI1	Bri1-like 3 (Brassinosteroid insensitive)	*Arabidopsis thaliana*	AT3G13380
SOBIR	Leucine-Rich Repeat Protein Kinase Family Proteins (Suppressor Of Bir1-1/Evershed)	*Arabidopsis thaliana*	AT2G31880
CRK4	Calcium-dependent protein kinase (CDPK) family proteins (Cysteine-rich receptor-like kinase 4)	*Arabidopsis thaliana*	AT5G24430
SERK1	Somatic embryogenesis receptor-like kinase 1	*Arabidopsis thaliana*	AT1G71830
PR1	Pathogenesis-related proteins group 1	*Arabidopsis thaliana*	AT2G14610
PR5	Pathogenesis-related proteins group 5	*Arabidopsis thaliana*	AT1G75040
NHL10	Late embryogenesis abundant (lea) hydroxyproline-rich glycoprotein family	*Arabidopsis thaliana*	NP_181142.1
ACRE31	Avr9/cf-9 rapidly elicited protein 31	*Nicotiana tabacum*	AAG43547.1
ACRE132	Avr9/cf-9 rapidly elicited protein 132	*Nicotiana tabacum*	AF211532.1
	Другие гены-мишени		
DCL	Dicer-Like proteins	*Allium sativum*	EPP005KGAA12S003959
RDR 6	RNA-dependent RNA polymerase 6	*Arabidopsis thaliana*	NP_001327617.1
AGO	Argonaute family proteins	*Triticum aestivum*	AGB34311.1
Tm2²	ToMV resistance protein	*Solanum lycopersicum*	AAQ10736.1
PR6	Pathogenesis-related proteins group 6	*Arabidopsis thaliana*	NP_199170.2
LTP	Lipid transfer proteins (Pathogenesis-related proteins group 14), (Antimicrobial protein Ace-amp1 precursor mRNA)	*Allium cepa*	AF004946.1
WRKY	WRKY transcription factors family proteins	*Arabidopsis thaliana*	AEC09374.1
TCTP	Translationally controlled tumor proteins	*Jatropha curcas*	EF091818.1
PIRL	Plant intracellular Ras group-related LRR proteins	*Arabidopsis thaliana*	NP_196204.1
DBP1	DNA-binding protein phosphatase 1	*Arabidopsis thaliana*	NP_001324148.1
CBP60g	CBP60G (Calmodulin-binding protein 60 G)	*Arabidopsis thaliana*	OAO89604.1
GRF6	G-box regulating factor 6	*Arabidopsis thaliana*	NP_001190276
FRK1	FRK (Fertilization-related kinase 1)	*Arabidopsis thaliana*	OAP09570.1

Примечание. Указаны ортологи, с помощью которых были получены оптимальные результаты при конструировании соответствующих праймеров (см. табл. 2, 3).

2. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных при определении уровней экспрессии маркеров Pattern-Triggered Immunity (PTI) при персистентной инфекции шалота (*Allium cepa* L. var. *aggregatum*) X вирусом шалота (ПЦР в реальном времени)

Праймер	Последовательность	ID транскрипта *Allium cepa* L. в базе данных TSA (NCBI)
ARM 530-L	5′- ATGATGCGGGCCTAGTAGAC -3′	GETF01031504.1
ARM 766-R	5′- CTCCCTCGATCAGTCCACTC -3′	
RBOHD 2641-L	5′- GTTTGATCCTAGACGACGCG -3′	GBRN01002659.1
RBOHD 2868-R	5′- TCAACATACCCGACCCGAAA -3′	
EDS5 303-L	5′- TCGCTTGGTCTTGGCTTCTA -3′	GBRQ01023449.1
EDS5 549-R	5′- CGTCTGAGAATCCAACGACG -3′	
LOX3 1753-L	5′- ATGCCACTCGTACGCTTTTC -3′	GBRQ01024907.1
LOX3 1943-R	5′- GACGCCTGCATCATTAGAGC -3′	
BRI1 1541-L	5′- TGTTCCCGCTCAGCTGATTA -3′	GBRQ01031765.1
BRI1 1749-R	5′- TACTTTCGGTGGCAATGGGA -3′	
SOBIR 812-L	5′- CAAGTCATGCAAGCTTCCGT -3′	GBRQ01012958.1
SOBIR 1041-R	5′- CTGGAAAGATGATCGCGGTG -3′	
AtCRK4 1496-L	5′- CTTTCTTGACCTTGGCCTCG -3′	GBGJ01061169.1
AtCRK4 1731-R	5′- TCCCCAGCTAAGCACATCAA -3′	
SERK1 1291-L	5′- CTTCTTCAGCGGGAACATCG -3′	GBGJ01064935.1
SERK1 1478-R	5′- TCCACCTCCTCCATTTGTCC -3′	
PR1 443-L	5′- GTCAAGATCGGTTGCGCTAG -3′	GBJZ01171295.1
PR1 660-R	5′- CCAAGCAAACTCTCATCGCA -3′	
PR5 616-L	5′- ACTGTCTACGGGCCCAAAAT -3′	GBGJ01079964.1
PR5 803-R	5′- ATATGCTGCCTCCGGAACTC -3′	
18s rRNA-L	5′- CATCAGCTCGCGTTGACTAC -3′	(22)
18s rRNA-R	5′- GATCCTTCCGCAGGTTCAC -3′	

3. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных при определении уровней экспрессии факторов РНК-сайленсинга, NB-LRR рецепторов и генов, принимающих участие в репродукции фитовирусов, при персистентной инфекции шалота (*Allium cepa* L. var. *aggregatum*) X вирусом шалота (ПЦР в реальном времени)

Праймер	Последовательность	ID транскрипта *Allium cepa* в базе данных TSA (NCBI)
Ago-L-672	5′-AACTCCCAAGAAGCTTTGCG-3′	GBGJ01050630.1
Ago-R-851	5′-CCCTCCTTGAGCAGTTCTGA-3′	

Продолжение таблицы 3

Tm2^2-L-3013	5′- TCGTGGGCTCTTTCACTGAT-3′	GBRN01023560
Tm2^2-R-3257	5′- CACCCGCTTCATTGGTGTAG-3′	
FRK1-L-421	5′-AGTCACGCTCAATGGCAATG-3′	GAAO01012059.1
FRK1-R-635	5′-CTGCCGCAACATCATAGCAT-3′	
NHL10-L-327	5′-TGCTCCTCACATCGTTCACA-3′	GBRQ01023138.1
NHL10-R-572	5′-AGCTCACCACCTTCACTCTC-3′	
ACRE31-L-473	5′-GCAGTTCTTCGAAAGCAGGA-3′	GBRO01073928.1
ACRE31-R-699	5′-ATTGAGCACATCCTCCCCTT-3′	
ACRE132-L-272	5′-GCCATGCCTCAACCTGATTT-3′	GBRQ01011764.1
ACRE132-R-451	5′-CCTTCTTGATCGGGAAAGCG-3′	
PR6-L-100	5′-ATGAGGGGTACATGGCAGAC-3′	GBRQ01165078.1
PR6-R-274	5′-AAGCATCGGAAGCGAAGAAG-3′	
LTP pcr-59- L	GCA-GTC-CGT-ATG-CAA-AT	AF004946.1
LTP pcr-274-R	TAG-GGT-TTC-GTC-TCA-GAC-CG	
WRKY-L-1367	5′-ACGTGGAAAGGGCATCAAAC-3′	GBRO01047677.1
WRKY-R-1550	5′-GCGACCGGTCTTTGAACATT-3′	
TCTP-L-172	5′-AGGGCAAGTGGGTAGTTCAA-3′	JR844934.1
TCTP-R-382	5′-TCCAATTTCGAAGGCAGAAGT-3′	
PIRL-L-84	5′-ATCATGGATCCAAGCCCCAA-3′	GAAN01019083
PIRL-R-377	5′-CTTTGCGAGGTCAACAGCTT-3′	
DBP-L-392	5′-AGGGTCGTTGTGCTCTTGTA-3′	GBRO01024689.1
DBP-R-623	5′-CAACGGTCAGCTCAACGTAG-3′	
CBP-L-429	5′- GAAGCAGAGGGAAAGCAACC-3′	GBRO01059419.1
CBP-R-673	5′- AAGCCAACACCATCATGCAG-3′	
GRF6-L-607	5′-TCCAGTCTTGAATTCGGCCA-3′	GAAN01023832.1
GRF6-R-829	5′-TTCGATCGAGCAGAAGGAGG-3′	
18S rRNA-L	CATCAGCTCGCGTTGACTAC	(22)
18S rRNA-R	GATCCTTCCGCAGGTTCAC	

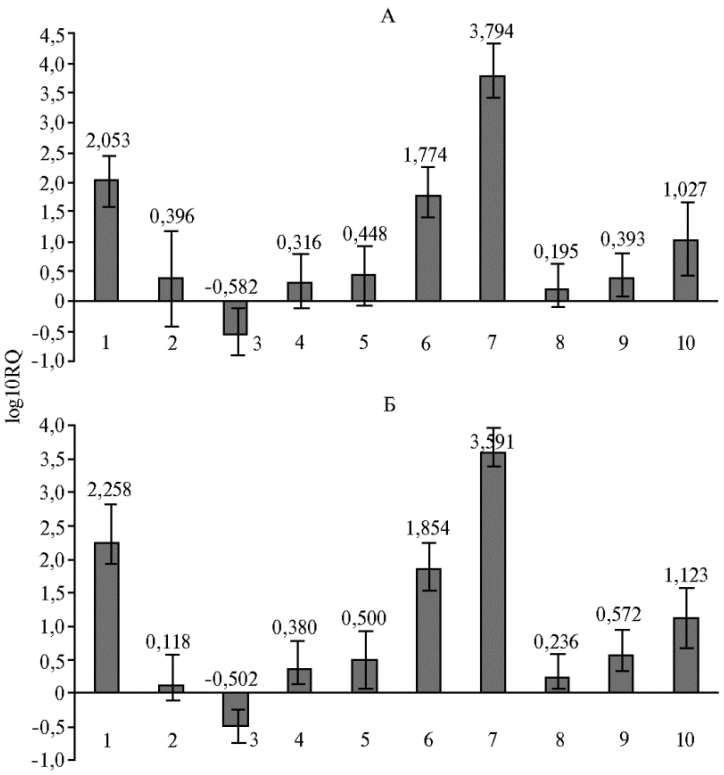

Рис. 1. Представленность транскриптов генов-маркеров Pattern-Triggered Immunity (PTI) в листьях (А) **и в корнях** (Б) **растений шалота (*Allium cepa* L. var. *aggregatum*) при персистентной инфекции X вирусом шалота через 2 нед после высадки луковиц:** RQ — Relative Quantification (изменения в экспрессии мРНК относительно величины для РНК внутреннего контроля); 1 — *ARM*, 2 — *BRI1*, 3 — *CRK4*, 4 — *EDS5*, 5 — *LOX3*, 6 — *PR1*, 7 — *PR5*, 8 — *RBOHD*, 9 — *SERK1*, 10 — *SOBIR* (обозначения генов-маркеров PTI см. в таблице 1).

Как следует из полученных результатов (см. рис. 1), в той или иной мере вирусная инфекция влияет на экспрессию всех исследованных генов, однако при этом выявляется группа генов с очень высокой экспрессией и в листьях, и в корнях инфицированных растений: SOBIR: log10RQ ~ 1.0; ARM: log10RQ ~ 2.0; PR1: log10RQ ~ 2.0; PR5: — log10RQ ~ 4.0 (!). Следовательно, можно сделать вывод, что ХВШ в период инициирования инфекции взаимодействует с компонентами механизма PTI и в результате индукции PTI запускается процесс ТРП.

На начальной стадии инфекционного процесса в проростках (рис. 2, А) активировалась экспрессии всех генов-мишеней (табл. 3) (за исключением *AGO* и *PIRL*), в том числе четырех дополнительных маркеров PTI и nsLTP (= PR14, Pathogenesis-Related Proteins Group 14). Через 2 нед инфекции ситуация в целом изменялась на противоположную (см. рис. 2, Б): в листьях подавлялась экспрессия большинства генов-мишеней, в том числе всех факторов РНК-сайленсинга (более других — белков-аргонавтов), трех маркеров PTI, NB-LRR рецепторов и белков CBP60g, контролирующих синтез салициловой кислоты. Однако в те же сроки в листьях экспрессия ACRE 132 и LTP (маркеры PTI) демонстрировала заметную тенденцию к росту, а экспрессия TCTP оставалась достаточно высокой и стабильной.

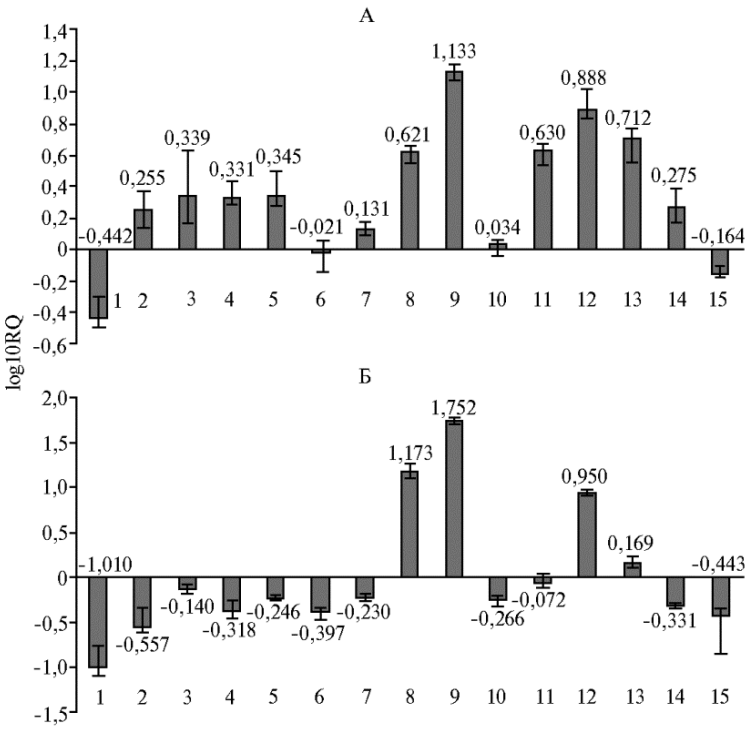

Рис. 2. Представленность транскриптов генов-мишеней в надземных органах растений шалота (*Allium cepa* L. var. *aggregatum*) на разных стадиях инфекции Х вирусом шалота: А — проростки (3 сут после высадки луковиц), Б — листья (2 нед после высадки луковиц); RQ — Relative Quantification (изменения в экспрессии мРНК относительно величины для РНК внутреннего контроля); 1 — *AGO*, 2 — *DCL*, 3 — *RDR*, 4 — *Tm2²*, 5 — *FRK1*, 6 — *NHL10*, 7 — *ACRE31*, 8 — *ACRE32*, 9 — *LTP*, 10 — *WRKY*, 11 — *CBP60g*, 12 — *TCTP*, 13 — *GRF6*, 14 — *DBP1*, 15 — *PIRL* (обозначения генов-маркеров PTI см. в таблице 1).

В корнях (рис. 3, А, Б) ингибирование экспрессии генов-мишеней отмечали уже на начальной стадии инфекционного процесса, а через 2 нед подавленной оказывается уже большая часть генов-мишеней, но экспрес-

сия LTP снижалась незначительно.

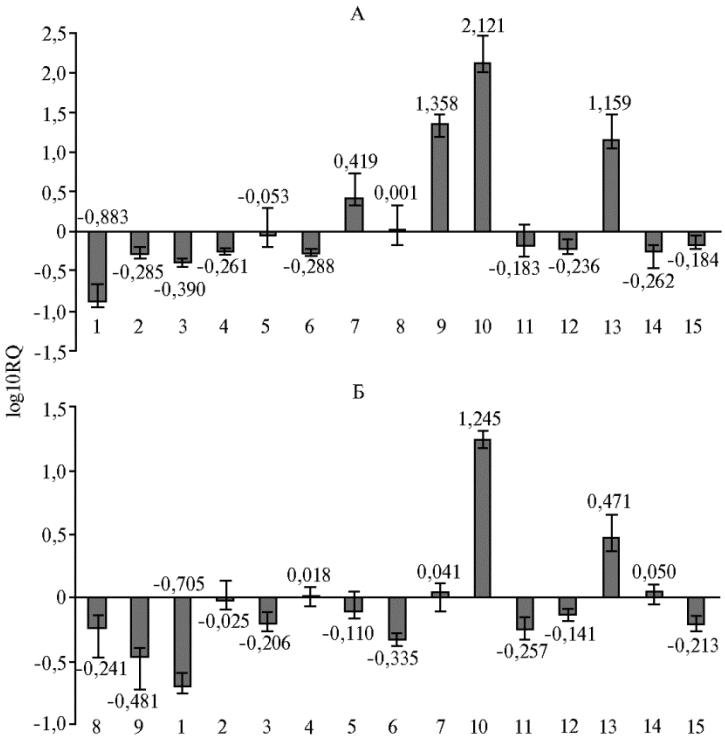

Рис. 3. Представленность транскриптов генов-мишений в корнях растений шалота (*Allium cepa* L. var. *aggregatum*) на разных стадиях инфекции X вирусом шалота: А — 3 сут после высадки луковиц, Б — 2 нед после высадки луковиц; RQ — Relative Quantification (изменения в экспрессии мРНК относительно величины для РНК внутреннего контроля); 1 — *AGO*, 2 — *FRK1*, 3 — *NHL10*, 4 — *CBP60g*, 5 — *DBP1*, 6 — *DCL*, 7 — *GRF6*, 8 — *ACRE31*, 9 — *ACRE132*, 10 — *LTP*, 11 — *PIRL*, 12 — *RDR*, 13 — *TCTP*, 14 — *Tm2²*, 15 — *WRKY* (обозначения генов-маркеров PTI см. в таблице 1).

Из представленных результатов следует, что в условиях персистентной инфекции ХВШ индуцирует в корнях и листьях растений динамический процесс транскрипционного репрограммирования (ТРП), избирательное изменение экспрессии ряда генов-мишеней, включая гены, кодирующие белки-маркеры PTI, факторы РНК-сайленсинга, NB-LRR рецепторы, липид-трансферные белки, а также белки, принимающие участие в репликации вируса (TCTP-комплекс). В конечном итоге в исследуемой патосистеме подавляется экспрессии всех факторов сайленсинга и некоторых NB-LRR рецепторов, что подтверждает нашу первоначальную гипотезу. Следует отметить высокую степень индукции фактора транскрипции WRKY (Group III) и генов PR-белков, в частности PR1, PR5 и PR14 (nsLTP), как характерную особенность репрограммирования.

Мы полагаем, что индукция PTI, ETI (Effector triggered immunity) (9) и обусловленное этим транскрипционное репрограммирование — механизмы, общие для всех РНК-содержащих вирусов. В результате реализации рецепторных и сигнальных функций, присущих факторам врожденной иммунной системы, в растениях активируются многочисленные и разнообразные иммунные реакции, в то числе РНК-сайленсинг. Их задача — контроль репродукции вируса, но не полная его элиминация. Со своей стороны, вирусы выработали механизмы противодействия иммунным реакциям растения-хозяина, в частности через белки-супрессоры. Многие фитовирусы кодируют супрессоры с очень слабой или преходящей активностью ли-

бо неактивные вовсе. Таким образом, с точки зрения вируса РНК-сайленсинг — далеко не абсолютное оружие клетки: его можно проигнорировать или ослабить с помощью белков-супрессоров либо транскрипционного репрограммирования. Выбор вирусом способа подавления системы антивирусного иммунитета зависит от того, как растение-хозяин решает дилемму «рост (развитие) или защита» (concept of growth-defence tradeoffs) (24).

Описанный в настоящем сообщении процесс ТРП обладает органной специфичностью и выраженным двухфазным характером: на ранних стадиях развития инфекции экспрессия большей части генов-мишеней активируется, на более поздних — подавляется. Анализ представленных фактов позволяет также сделать вывод о том, что в проростках, листьях и корнях инфицированных растений индуктором транскрипционного репрограммирования, вероятно, служит PTI, но не сайленсинг с участием не идентифицированного в настоящей работе паралога семейства Ago-белков, экспрессия которого, как следует из представленных данных (см. рис. 2, 3), интенсивно подавляется на всех стадиях инфекционного процесса. Можно, однако, предположить, что на той или иной стадии инфекции транскрипционное репрограммирование может быть обусловлено также активностью специфического комплекса факторов сайленсинга (например, Ago2 + DCL4 + RDR1), экспрессия которых в условиях настоящего эксперимента, вероятно, не подавлялась. В результате этой активности генерируются эндогенные малые интерферирующие РНК (принадлежат к обширному классу активируемых вирусной инфекцией клеточных siRNA — vasiRNAs, virus-activated siRNAs) (25), мишенями которых служат различные гены растения-хозяина. Не исключено также, что при персистентной инфекции ХВШ индукция транскрипционного репрограммирования может быть обусловлена РНК-сайленсингом с участием малых интерферирующих РНК, источником которых служит вирусный геном (26). Кроме того, в исследуемой патосистеме в результате действия неизвестного пока механизма может изменяться уровень экспрессии определенных видов микроРНК, контролирующих процесс ТРП (27).

Мы считаем, что ключевое направление дальнейших исследований механизма индукции и роли ТРП в формировании антивирусного фитоиммунитета — идентификация участвующих в PTI антивирусных PRR растительной клетки и выяснение молекулярных механизмов взаимодействия этих рецепторов с репликативными (двуцепочечными) формами вирусных РНК. Фундаментальные особенности индуцируемого вирусными PAMPs процесса PTI дают основание полагать, что клонирование и межвидовой перенос генов антивирусных PRR растительной клетки может оказаться перспективной технологией создания новых форм сельскохозяйственных растений, обладающих высокой длительной резистентностью к широкому кругу патогенных вирусов (28).

Итак, впервые в мире экспериментально показано, что персистентная инфекция X вируса шалота индуцирует в корнях и листьях растений шалота динамический процесс транскрипционного репрограммирования, в результате чего наблюдается изменение экспрессии широкого спектра генов-мишеней, включая гены, кодирующие белки-маркеры PTI, факторы РНК-сайленсинга, NB-LRR рецепторы, PR-белки, а также белки, принимающие участие в репликации вируса.

ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии,
127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42,
e-mail: iab@iab.ac.ru, batler51@yandex.ru, vish@iab.ac.ru ✉

Поступила в редакцию
21 февраля 2018 года

PATTERN-TRIGGERED IMMUNITY (PTI) INDUCTION AND TRANSCRIPTIONAL REPROGRAMMING IN PERSISTANT ALLEXIVIRUS INFECTION

A.V. Arkhipov, V.K. Vishnichenko

All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Federal Agency of Scientific Organizations, 42, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia, e-mail iab@iab.ac.ru, batler51@yandex.ru, vish@iab.ac.ru (✉ corresponding author)

ORCID:

Arkhipov A.V. orcid.org/0000-0003-1195-6086 Vishnichenko V.K. orcid.org/0000-0002-6975-4885

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

This work is performed within the frame of research project «Study of the molecular mechanisms of RNA silencing suppression by plant viruses with attention to shallot and plum sharka viruses» (State Assignment No 0574-2015-0003 of 2017).

Received February 21, 2018 doi: 10.15389/agrobiology.2018.5.947eng

Abstract

In virus—plant interactions, one of the major mechanisms for plant antiviral immunity relies on RNA silencing, which is often suppressed by co-evolving viral suppressors, thus enhancing viral pathogenicity in susceptible hosts. However RNA silencing should not only be viewed as an antiviral mechanism that must be counteracted. In fact, many viruses encode weak or transiently active suppressors and probably do not use these viral proteins for control RNA silencing; for example, Shallot virus X (ShVX) do not code the active silencing suppressor and consequently use the another molecular mechanism to overcome the silencing immune barrier, establish the persistent infection and prevent catastrophic damage to its host. We hypothesized that this "non-suppressor" mechanism is the process of transcriptomic reprogramming (TRP) induced by the PTI (pattern-triggered immunity), the first layer of plant defence, which is triggered by specific recognition of conserved microbe- or pathogen-associated molecular patterns (MAMPs, or PAMPs, respectively) by pattern recognition receptors (PRRs) at the plasma membrane and the induction of defense signaling. Recently a role of PTI in antiviral defence has been demonstrated in *Arabidopsis* by showing that mutants in the PRR (PRRs, Pattern recognition receptors) coreceptor kinases exhibit increased susceptibility to different RNA viruses. Our preliminary results confirm this hypothesis and show that there is a negative correlation between the ShVX reproduction rates and the levels of RNA-dependent RNA-polymerase (RDR) and DCL proteins in roots and leaves of infected shallot plants. The task of this study is the experimental verification of our PTI-induced TRP hypothesis by quantitative real-time PCR (Comparative CT experiment, delta-delta CT algorithm; calibrator: healthy shallot seedlings; normalizer: 18S RNA; The 7500/7500 Fast Real-Time PCR Systems, Applied Biosystems, USA) to evaluate in vivo expression levels of transcripts coding PTI markers, factors of RNA-silencing, NB-LRR receptors and complex of TCTP-PIRL-GRF6-DBP1 proteins in the healthy and ShVX-infected shallot (*Allium cepa* L. var. *aggregatum* L.G. Don) plants. In this study for the first time we obtained the convincing data about PTI and TRP induction in ShVX-infected shallot plants. As result of TRP, repression of all factors of RNA-silencing, some NB-LRR receptors (e.c., *Tm2²*) and some proteins of TCTP-PIRL-GRF6-DBP1 complex take place in this virus—plant system. On the other hand, group of defense genes with high expression levels has been discovered in this system: *SOBIR* — log10RQ ~ 1.0; *ARM* (genes encoding armadillo protein family) — log10RQ ~ 2.0; Pathogenesis-related protein 1, *PR1* — log10RQ ~ 2.0; Pathogenesis-related protein 5, *PR5* — log10RQ ~ 4.0 (!); Pathogenesis-related protein 14 = nsLTP — log10RQ ~ 2.0. So, in leaves and roots of infected plants ShVX programs dynamical and coordinated process of TRP and downregulation of genes coding for core RNAi components and disease resistance proteins might be correlated with successful virus reproduction and persistent virus infection establishment. We are of opinion that plant viral-specific PRRs identification, plant viral PAMP-triggered PTI and PRR (Pattern recognition receptors)-mediated transcriptomic reprogramming mechanisms ascertainment are the main tasks of coming antiviral plant immunity research period. Cloning of plant PRRs involved in plant virus PAMPs recognition, and the inter-species transfer of plant virus-sensing PRRs are the promising future technologies for broad spectrum antiviral resistant plants creation (D. Bao et al., 2017).

Keywords: allexiviruses, Shallot virus X, *Allium cepa* L. var. *aggregatum* L.G. Don, persistant infection, RNA-silencing, plant innate immune system, Pattern-triggered immunity (PTI), transcriptomic reprogramming.

REFERENCES

1. Calil I.P., Fontes E.P.B. Plant immunity against viruses: antiviral immune receptors in focus.

Annals of Botany, 2016, 119(5): 711-723 (doi:10.1093/aob/mcw200).
2. Ghoshal B., Sanfaçon H. Symptom recovery in virus-infected plants: revisiting the role of RNA silencing mechanisms. *Virology*, 2015, 479-480: 167-179 (doi: 10.1016/j.virol.2015.01.008).
3. Burgyan J., Havelda Z. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci.*, 2011, 16(5): 265-72 (doi: 10.1016/j.tplants.2011.02.010).
4. Csorba T., Kontra L., Burgyan J. Viral silencing suppressors: tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology*, 2015, 479-480: 85-103 (doi: 10.1016/j.virol.2015.02.028).
5. Sanfaçon H. Grand challenge in plant virology: understanding the impact of plant viruses in model plants, in agricultural crops, and in complex ecosystems. *Front. Microbiol.*, 2017, 8: 860 (doi: 10.3389/fmicb.2017.00860).
6. Arkhipov A.V., Solov'ev A.G., Vishnichenko V.K. *Doklady RASKHN*, 2013, 2: 4-7 (in Russ.).
7. Li B., Meng X., Shan L., He P. Transcriptional regulation of pattern-triggered immunity in plants. *Cell Host & Microbe*, 2016, 19(5): 641-650 (doi: 10.1016/j.chom.2016.04.011).
8. Hillmer R.A., Tsuda K., Rallapalli G., Asai S., Truman W., Papke M.D., Sakakibara H., Jones J.D.G., Myers C.L., Katagiri F. The highly buffered Arabidopsis immune signaling network conceals the functions of its components. *PloS Genet.*, 2017, 13(5): e1006639 (doi: 10.1371/journal.pgen.1006639).
9. Jones J.D.G., Dangl J.L. The plant immune system. *Nature*, 2006, 444: 323-329 (doi: 10.1038/nature05286).
10. Arkhipov A.V., Solov'ev A.G., Vishnichenko V.K. *Molekulyarnaya biologiya*, 2017, 51(1): 126-130 (doi: 10.7868/S0026898417010037) (in Russ.).
11. Korner C.J., Klauser D., Niehl A., Dominguez-Ferreras A., Chinchilla D., Boller T., Heinlein M., Hann1 D.R. The immunity regulator BAK1 contributes to resistance against diverse RNA viruses. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2013, 26: 1271-1280 (doi: 10.1094/MPMI-06-13-0179-R).
12. Niehl A., Wyrsch I., Boller T., Heinlein M. Double-stranded RNAs induce a pattern-triggered immune signaling pathway in plants. *New Phytol.*, 2016, 211(3): 1008-1019 (doi: 10.1111/nph.13944).
13. Mitter N., Worrall E.A., Robinson K.E., Ping X.Z., Carroll B.J. Induction of virus resistance by exogenous application of double-stranded RNA. *Curr. Opin. Virol.*, 2017 26: 49-55 (doi: 10.1016/j.coviro.2017.07.009).
14. Zipfel C. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 2008, 20(1): 10-16 (doi: 10.1016/j.coi.2007.11.003).
15. Zipfel C. Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol.*, 2014, 35: 345-351 (doi: 10.1016/j.it.2014.05.004).
16. Macho A.P., Zipfel C. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Mol. Cell*, 2014, 54(2): 263-272 (doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.028).
17. Bartels S., Boller T. Quo vadis, Pep? Plant elicitor peptides at the crossroads of immunity, stress, and development. *J. Exp. Bot.*, 2015, 66(17): 5183-5193 (doi: 10.1093/jxb/erv180).
18. Boutrot F., Zipfel C. Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2017, 55: 257-286 (doi: 10.1146/annurev-phyto-080614-120106).
19. Hruz T., Laule O., Szabo G., Wessendorp F., Bleuler S., Oertle L., Widmayer P., Gruissem W., Zimmermann P. Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in Bioinformatics*, 2008, 2008: Article ID 420747 (doi: 10.1155/2008/420747).
20. Lamm C.E., Kraner M.E., Hofmann J., Bцrnke F., Mock H.-P., Sonnewald U. Hop/Sti1 — a two-faced cochaperone involved in pattern recognition receptor maturation and viral infection. *Front. Plant Sci.*, 2017, 8: 1754 (doi: 10.3389/fpls.2017.01754
21. Bruckner F.P., Xavier A.D., Cascardo R.S., Otoni W.C., Zerbini F.M., Alfenas-Zerbini P. Translationally controlled tumour protein (TCTP) from tomato and *Nicotiana benthamiana* is necessary for successful infection by a potyvirus. *Mol. Plant Pathol.*, 2017, 18(5): 672-683 (doi: 10.1111/mpp.12426).
22. Meng X., Chen Q., Fan H., Song T., Cui N, Zhao J., Jia S., Meng K. Molecular characterization, expression analysis and heterologous expression of two translationally controlled tumour protein genes from *Cucumis sativus*. *PLoS ONE*, 2017, 12(9): e0184872 (doi: 10.1371/journal.pone.0184872).
23. Arkhipov A.V., Vishnichenko V.K. The dicer-like proteins coding nucleotide sequences in shallot *Allium cepa* L. var. *aggregatum* G. Don. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya* [*Agricultural Biology*], 2011, 5: 51-55 (in Engl.).
24. Huot B., Yao J., Montgomery B.L., He S.Y. Growth-defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. *Mol. Plant*, 2014, 7(8): 1267-1287 (doi: 10.1093/mp/ssu049).
25. Cao M., Du P., Wang X., Yu Y.Q., Qiu Y.H., Li W., Gal-On A., Zhou C., Li Y., Ding S.W. Virus infection triggers widespread silencing of host genes by a distinct class of endogenous siRNAs in *Arabidopsis*. *PNAS USA*, 2014, 111(40): 14613-14618 (doi: 10.1073/pnas.1407131111).
26. Xu D., Zhou G. Characteristics of siRNAs derived from Southern rice black-streaked dwarf virus in infected rice and their potential role in host gene regulation. *Virol. J.*, 2017, 14(1): 27 (doi: 10.1186/s12985-017-0699-3).

27. Bao D., Ganbaatar O., Cui X., Yu R., Bao W., Falk B.W., Wuriyanghan H.. Down-regulation of genes coding for core RNAi components and disease resistance proteins via corresponding microRNAs might be correlated with successful *Soybean mosaic virus* infection in soybean. *Mol. Plant Pathol.*, 2018, 19(4): 948-960 (doi: 10.1111/mpp.12581).
28. Nicaise V. Boosting innate immunity to sustainably control diseases in crops. *Curr. Opin. Virol.*, 2017, 26: 112-119 (doi: 10.1016/j.coviro.2017.07.030).

Science events

10th ANNUAL RNA THERAPEUTICS CONFERENCE

(February 20-21, 2019, London, United Kingdom)

Undoubtedly, the field of RNA therapeutics is currently undergoing a major expansion, and the potential for using RNA drugs for personalised medicines and immunotherapy, as well as to address genetic, infectious and chronic diseases will ensure the continued development of RNA therapeutics for years to come.

Disciplines: chemistry, life science, computer science, health science

Information: http://www.therapeutics-rna.com/gel

7th EDITION OF INTERNATIONAL CONFERENCE ON PHARMACOGNOSY AND MEDICINAL PLANTS

(March 11-12, 2019, London, United Kingdom)

Subdisciplines: biology, biochemistry, botany, toxicology, biotechnology, complementary medicine, pharmacy & pharmacology

Information: http://pharmacognosy.euroscicon.com/

ICSD 2019: 7th INTERNATIONAL CONFERENCE ON SUSTAINABLE DEVELOPMENT

(September 4-5, 2019, Rome, Italy)

Subdisciplines: geology, soil science, environmental science, ecology, physiology, environmental engineering, environmental chemistry, earth science, life science, geography, agriculture, climatology, hardware & architecture, social & economic medicine, health science, sports medicine, energy, energy, carbon, education, business and management science, public health

Information: http://www.globaleventslist.elsevier.com/events/2016/09/4th-international-conference-on-sustainable-development-icsd-2016-rome-italy

EMBL COURSE: GENOME ENGINEERING: CRISPR/Cas

(September 17-21, 2018, Heidelberg, Germany)

Subdisciplines: biology, molecular biology, biotechnology

This course will provide hands-on training in genome editing and cell engineering in mammalian cells using the highly efficient CRISPR/Cas9 system. Participants will learn design of CRISPR targets using bioinformatics tools, generation of gene knockouts/knock-ins, and target validation using the most current technologies. This course is aimed at researchers who are familiar with basic molecular and cell biology techniques and want to learn how to create an engineered mammalian cell line using the most recent and advanced CRISPR/Cas9 system. No previous experience in genome editing is required.

Information: http://www.globaleventslist.elsevier.com/events/2018

SMi's 8th ANNUAL PHARMACEUTICAL MICROBIOLOGY UK

(January 21-22, 2019, London, United Kingdom

Addressing the key challenges, trends and strategies in contamination control

Subdisciplines: microbiology, medicine, chemical engineering, biomedical engineering, life science, process engineering, toxicology, biotechnology, general & internal medicine, medical computation & informatics, pharmacy & pharmacology, health science, knowledge transfer, medical ethics / bioethics, medical technology, systems engineering

Information: http://www.globaleventslist.elsevier.com/events/2016/02/parallel-trade/