

На правах рукописи

Архипов Андрей Владимирович

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ X ВИРУСА ШАЛОТА (РОД ALLEXIVIRUS)
С ФАКТОРАМИ АНТИВИРУСНОГО ИММУНИТЕТА
РАСТЕНИЯ-ХОЗЯИНА

Специальность: 1.5.6 – биотехнология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2024

Работа выполнена в лаборатории молекулярной вирусологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), г. Москва

Научный руководитель:

Вишниченко Валерий Константинович,
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория ДНК-маркеров растений, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ).

Официальные оппоненты:

Игнатов Александр Николаевич,
доктор биологических наук, профессор, агробиотехнологический департамент, аграрно-технологический институт, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН)

Джавахия Виталий Георгиевич,
кандидат биологических наук, заведующий отделом молекулярной биологии, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии» (ФГБНУ ВНИИФ)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр овощеводства» (ФГБНУ ФНЦО)

Защита состоится 10 октября 2024 г. в 13.30 на заседании диссертационного совета 24.1.016.01 (Д 006.027.01), на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ) по адресу 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42, тел. +7(499)976-65-44.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института и на официальном сайте ФГБНУ ВНИИСБ <http://www.vniisb.ru/ru/council/>

Автореферат разослан _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Романов Дмитрий Викторович

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Растения постоянно подвергаются атакам со стороны разнообразных вирусных патогенов и реагируют на эти атаки, используя сложно устроенную иммунную систему. До недавнего времени в литературе наблюдалась тенденция рассматривать в качестве главного фактора антивирусного фитоиммунитета РНК-сайленсинг. В последнее время появляется все больше данных позволяющих считать, что в растительной клетке функционируют, по меньшей мере, два антивирусных иммунных механизма, "запускаемых" при участии двуцепочечных вирусных РНК – РНК-сайленсинг и РТИ. Процесс РТИ (pattern triggered immunity – паттерн-активированный иммунитет) инициируется в результате специфического узнавания двуцепочечных вирусных РНК, являющихся молекулярными паттернами, на настоящий момент неизвестными клеточными рецепторами, локализованными на плазмемной мембране растительной клетки. В свою очередь, РНК-сайленсинг представляет собой обусловленный гомологией нуклеотидных последовательностей эпигенетический механизм инактивации вирусных генов, индуктором каскада реакций которого являются репликативные (двуцепочечные) формы вирусных РНК, а ключевыми факторами дайсер-подобные белки (DCL), аргонавты (AGO) и РНК зависима РНК-полимераза (RDR).

Исследование взаимодействия данных молекулярных процессов между собой и влияния вирусного патогена на это взаимодействие, представляется актуальным.

Понимание молекулярных механизмов, обуславливающих состояние толерантности растений к вирусной инфекции, позволит выяснить, как эти процессы могут быть перепрограммированы с целью конструирования форм сельскохозяйственных растений, находящихся во взаимовыгодных симбиотических отношениях с инфицирующими их вирусами.

В качестве модели при решении поставленной задачи мы использовали персистентную инфекцию X вируса шалота (ХВШ), типового представителя нового рода аллексивирусов, в растениях вида *Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don являющимся новым и до настоящего исследования, считавшегося единственным восприимчивым хозяином ХВШ.

Вирус передается клещем *Aceria tulipae*. Вирион – нитевидный. Геном представляет собой одноцепочечную РНК (+) полярности, содержащую шесть открытых рамок считывания, кодирующих: вирусную репликазу, белки, гомологичные транспортным белкам ТБГ1 и ТБГ2 многих нитевидных и палочковидных вирусов растений, уникальный белок р42, капсидный и цистеин-богатый белки.

Существенную роль в видообразовании, то есть приданию вирусному организму его уникальных свойств играют таксонспецифичные (ORFan) белки, возникающие в результате длительного процесса эволюции путем одиночных замен, сдвига рамки считывания, либо интенсивных мутаций, в ответ на требование приспособиться к изменениям условий среды.

Для X вируса шалота таким является таксонспецифичный белок р42. Нуклеотидная последовательность, кодирующая р42, не имеет гомологов за пределами рода и является молекулярной сигнатурой аллексивирусов.

Помимо России, ХВШ в настоящее время обнаружен в Германии, Голландии, Индии, Новой Зеландии, Судане и в настоящем исследовании в Эквадоре.

Репродукция исследуемого в настоящей работе российского штамма ХВШ поддерживалась в вегетативно размножаемых растениях шалота в течение 20 лет.

Представляется актуальным изучение изменений, которые могли произойти в вирусном геноме в процессе длительной адаптации к условиям размножения в новом хозяине, позволяющих вирусу успешно противостоять врожденному иммунитету растений.

До настоящего исследования полностью отсутствовала информация о экспрессии молекулярных факторов иммунитета Шалота, как генов, задействованных в процессе РНК-сайленсинга так и генов, задействованных в РТИ. Хотя общепринятым является представление о том, что в условиях функционирования РНК-сайленсинга ключевую роль в обеспечении успешной репродукции фитовирусов играют вирусные белки-супрессоры, в ходе настоящего исследования установлено отсутствие супрессорной активности белков, кодируемых геномом ХВШ. Следовательно, вирус преодолевает иммунный барьер сайленсинга с помощью каких-то иных механизмов. В качестве основной гипотезы мы предположили, что таким механизмом может быть индукция вирусом РТИ и, как следствие, специфическое транскрипционное репрограммирование, приводящие к подавлению экспрессии ключевых факторов фитоиммунитета.

Степень разработанности

В 1971г., показана возможность передачи клещом *Aceria tulipae* некоего не идентифицированного растительного вируса репродуцирующегося в *Allium cepa* (Razvjazkina, 1971).

В 1993, в лаборатории молекулярной вирусологии ВНИИСБ, открыт гибкий, палочковидный, передающийся клещом вирус, обладающий характерным, присущим только ему, строением генома. Вирус назван X вирусом шалота. (Vishnichenko, et.al., 1993, Kanyuka, et.al., 1992).

В 1993-2000 гг, различными группами исследователей сообщалось о вирусах, обладающих сходной с ХВШ организацией генома. (Sumi et. al., 1993, Barg et. al., 1994, Helguera et. al., 1996, Yamashita et. al., 1996, Song et. al., 1998, Sumi et. al., 1999).

В 2000 г., сотрудниками лаборатории молекулярной биотехнологии ВНИИСБ, предложено выделить новый род растительных вирусов - *Allxivirus (Allium X virus)*, прототипом которого является X вирус шалота. (Zavriev, Vishnichenko, 2000).

Лук шалот, *Allium cepa var. aggregatum G. Don.*, до настоящего исследования, считался единственным восприимчивым хозяином ХВШ.

До настоящего исследования полностью отсутствовала информация о экспрессии молекулярных факторов иммунитета Шалота, как генов, задействованных в процессе РНК-сайленсинга так и генов, задействованных в РТИ.

Цель исследования

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния инфекции X вируса шалота на механизмы иммунной системы растения хозяина.

Задачи исследований

В связи с тем, что информация об особенностях молекулярной биологии X вируса шалота крайне ограничена, предполагалось решение следующих задач:

1. Провести анализ и выявить возможные адаптационные изменения, произошедшие в вирусном геноме в процессе длительной репродукции в вегетативно размножаемых растениях шалота.

2. Идентифицировать обладающие супрессорной активностью белки X вируса шалота, позволяющие эффективно ингибировать локальный и системный сайленсинг генов - один из механизмов антивирусного иммунитета.

3. Идентифицировать в геноме *Allium cepa var. aggregatum G. Don.*, нуклеотидные последовательности, кодирующие ключевые факторы антивирусного иммунитета.

4. Сравнить относительный уровень экспрессии генов, участвующих в антивирусном фитоиммунитете, в безвирусном и инфицированном ХВШ шалоте.

5. Экспериментально проверить гипотезу, согласно которой ХВШ оказывается способным репродуцироваться в растениях шалота благодаря его способности индуцировать РТИ и транскрипционное репрограммирование, в результате чего вирус подавляет различные факторы антивирусного иммунитета.

6. Проверить гипотезу о *Allium cepa var. aggregatum G. Don.*, как единственном растении-хозяине X вируса шалота.

Научная новизна и практическая значимость работы

В данной работе установлен факт репродукции X вируса шалота в отсутствие собственного белка супрессора РНК – сайленсинга.

Подтверждена гипотеза, объясняющая факт репродукции ХВШ, в отсутствие собственного белка супрессора, способностью вируса полностью или частично изменять экспрессию белков, задействованных в обеспечении антивирусного фитоиммунитета.

Подавление экспрессии ключевых факторов РНК-сайленсинга в инфицированных растениях и, контролируемое во времени, избирательное изменение уровней экспрессии ряда генов-мишеней, кодирующих другие факторы антивирусного фитоиммунитета, обусловлено индукцией вирусом процесса РТИ.

В настоящей работе установлен факт репродукции ХВШ в посадках чеснока (*Allium sativum*). До проведения актуального исследования предполагалось, что единственным хозяином ХВШ является шалот (*Allium cepa var. aggregatum G. Don*).

Методология и методы исследования

В работу вошли данные, полученные с использованием молекулярно-биологических и биотехнологических методов лабораторного анализа: метод обратной транскрипции, ПЦР по конечной точке, ПЦР в реальном времени, секвенирование по Сэнгеру, способ создания векторных конструкции на основе плазмиды РЛН 7000 методом рестрикции и лигирования, Вестерн-блоттинг.

Работа выполнена в лаборатории молекулярной вирусологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), г.Москва.

Автор выражает благодарность коллегам Центра инженерных исследований и разработок, Кито, Эквадор [Universidad Tecnológica Equinoccial (UTE), Facultad de Ciencias de la Ingeniería e Industrias, Quito, Ecuador; G. Landázuri, Centro de Investigación, Estudios y Desarrollo de Ingeniería (CIEDI), Quito, Ecuador], за любезно предоставленную возможность исследовать репродукцию X вируса шалота в чесноке на посадках Алаузи, провинция Чимборасо, Эквадор.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

– Функциональные модули РНК-генома ХВШ, демонстрируют различную скорость эволюционных изменений, имеющих явный адаптационный характер, приобретенный в результате репродукции в новом хозяине.

– Репродукция X вируса шалота проходит, в отсутствие собственного белка супрессора. Установлено отсутствие супрессорной активности РНК-сайленсинга у белков, кодируемых геномом X вируса шалота.

– Впервые идентифицированы последовательности кодирующие фрагменты генов обуславливающие антивирусный фитоиммунитет (факторы РНК-сайленсинга, РТИ, аутофагии и RNA Quality Control) *Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don. Представлен анализ уровней экспрессии данных последовательностей.

– Подтверждена гипотеза, объясняющая факт репродукции X вируса шалота, в отсутствие собственного белка супрессора, способностью вируса полностью или частично изменять экспрессию белков, задействованных в обеспечении антивирусного фитоиммунитета. Подавление экспрессии ключевых факторов РНК-сайленсинга в инфицированных растениях и, контролируемое во времени, избирательное изменение уровней экспрессии ряда генов-мишеней, кодирующих другие факторы антивирусного фитоиммунитета, обусловлено индукцией вирусом процесса РТИ.

– Показана возможность репродукции ХВШ в *Allium sativum* L.

Степень достоверности и апробация результатов

Основные результаты исследований доложены на всероссийских и международных научно-практических конференциях: Международная научно-практическая конференция «Иммунитет растений к инфекционным заболеваниям», посвященная 100-летию монографии Н.И. Вавилова (Москва, 2019); VIII научно-практическая конференция с международным участием. «Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции» (Ростов-на-Дону, 2019); XVII молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2017); XIII молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2013); IX молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2009).

Достоверность полученных результатов основывается на использовании достаточного объема экспериментального материала, соответствующих для поставленных задач методов исследования и методов обработки данных.

По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 1 статья в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных, 5 работ в сборниках научных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 187 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, глав с описанием использованных материалов и методов, глав с описанием полученных результатов, заключения и списка цитируемой литературы, включающего 238 отечественных и зарубежных источников. Полученные данные сведены в 16 таблиц и проиллюстрированы 23 рисунками.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Основные научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 1.5.6 – Биотехнология, а именно областям исследований: генетические, селекционные и иммунологические исследования в прикладной микробиологии, вирусологии и цитологии; иммунная биотехнология и др.

Личный вклад

Все технические действия согласно методам, представленным в настоящей работе, выполнялись непосредственно автором.

Анализ полученных данных, описание и обсуждение результатов, оформление диссертации и автореферата выполнены автором самостоятельно.

Автор принимал непосредственное участие в подготовке к публикации в научных изданиях статей и тезисов по материалам диссертационной работы.

Содержание работы

1. Анализ изменений в геноме X-вируса шалота, персистирующего в вегетативно размножаемом шалоте

Открытый и описанный в России X вирус шалота был выделен из растений *Allium cepa var. aggregatum G. Don.* (селекционный образец N803), инокулированных экстрактом растений шалота монгольского сорта Тагар, инфицированных потивирусом желтой карликовости лука (ВЖКЛ). Было обнаружено, что гибкие вирусные частицы, накапливающиеся в значительных количествах в растениях шалота N803, не принадлежат ВЖКЛ, а представляют собой вирионы нового, неизвестного ранее вируса, ставшего типовым для нового рода *Allexivirus*.

Впоследствии данный, российский изолят X вируса шалота, поддерживаемый в течение, по крайней мере двадцати лет, в вегетативно размножаемых растениях шалота селекционного образца N803, не инфицированных карла- или потексвирусами, то есть в условиях моноинфекции, использовался в настоящей работе, для анализа тех изменений, которые произошли в вирусном геноме в процессе столь длительной репродукции.

Препарат ХВШ выделялся из зараженных растений шалота. Последовательность концевых районов генома X вируса шалота определяли с помощью набора для быстрой амплификации концов РНК (FirstChoice RLM-RACE Kit, Ambion). Для определения последовательности основной части генома использовались пятнадцать пар специфических олигонуклеотидов, созданных на основе ранее определенной последовательности генома ХВШ.

В результате был получен набор фрагментов ДНК, перекрывающихся между собой, а также с последовательностями, определенными для концевых районов генома.

Полученные фрагменты клонировали в составе вектора pAL-TA (Евроген) и секвенировали. Полная последовательность РНК ХВШ, длина которой составила 8898 нуклеотидных остатков, не считая поли(А)-концевой части, была депонирована в базе данных GeneBank (номер JX310755).

Сравнение полученной последовательности генома ХВШ с опубликованной ранее последовательностью родительского изолята, проведенное с помощью программы ClustalW2, показало их сходство на 92,6%. Уровень дивергенции, соответственно, составляет 7.4%, или 0.37% в год, или 31 мутация на геном в год, что примерно в 3 раза превышает уровень мутаций у других РНК-содержащих вирусов.

Для анализа распределения выявленных замен в последовательности генома ХВШ была использована программа PLOTCON, с помощью которой был построен график сходства, основанный на выравнивании новой и ранее опубликованной последовательностей генома. (Рис. 1).

Построенный график выявил, что различные районы генома ХВШ проявляют разную степень сходства нуклеотидных последовательностей родительского и дочернего изолятов ХВШ. Район, включающий открытые рамки считывания 2, 3 и 4 (гены белков ТБГ1, ТБГ2 и р42), содержит существенно большее число отличий между двумя последовательностями, чем другие районы генома. Кроме того, район, кодирующий домен MET вирусной репликазы, оказался более вариабельным, чем районы, кодирующие другие домены того же белка, но менее вариабельным, чем район генов ТБГ1, ТБГ2, р42 (Рис. 1).

Таким образом, можно сделать вывод, что, по крайней мере, часть наблюдаемых различий между геномными последовательностями родительского и дочернего изолятов ХВШ является результатом изменений, произошедших в период персистенции вируса в вегетативно размножаемых растениях шалота N803.

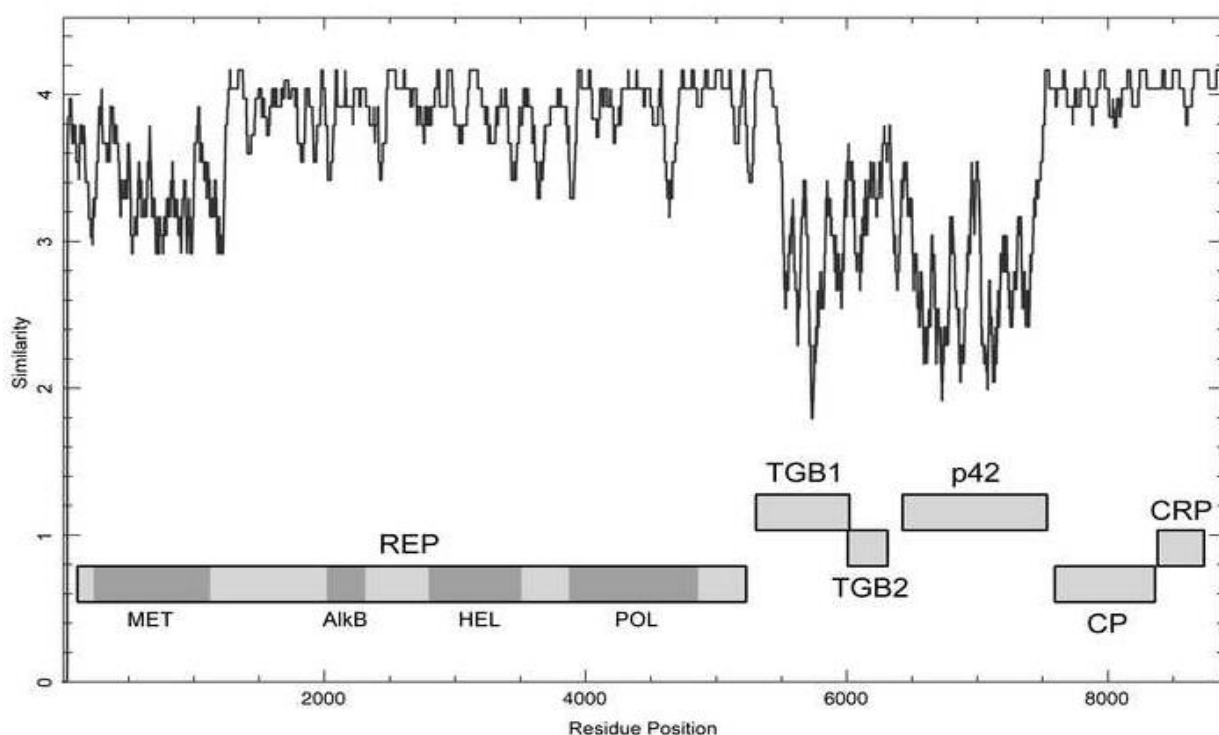


Рисунок 1. Схема сходства выровненных нуклеотидных последовательностей ShVX JX310755 и установленной ранее, полученная с использованием сетевого приложения PLOTCON с шагом в 60 оснований. Сходство последовательностей представлено напротив их положений. Светло-серым цветом отмечены области генов ShVX. Темно-серым цветом отмечены консервативные области вирусной репликазы.

Попарные сравнения аминокислотных последовательностей кодируемых белков показали, что большее количество различий нуклеотидных последовательностей, найденное для домена MET в сравнении с другими доменами репликазы, не приводит к большему количеству аминокислотных замен: идентичность аминокислотных последовательностей доменов репликазы составила 98,7% для MET, 96,6% для AlkB, 99,6% для HEL и 99,1% для POL.

С другой стороны, уровень сходства аминокислотных последовательностей белков ТБГ1, ТБГ2 и р42, составляющий менее 90% соответствовал уровню сходства нуклеотидных последовательностей данных генов и был существенно ниже, чем уровень сходства капсидного (КБ) и цестеин богатого (ЦББ) белков.

Кроме того, было обнаружено, что аминокислотные замены в кодируемом ОРС2 белке ТБГ1 распределены неслучайным образом. Пять из 25 аминокислотных замен (20%) локализируются в последовательностях консервативных мотивов, тогда как на кодирующие их районы гена приходится 30% нуклеотидных замен. Эти наблюдения свидетельствуют в пользу того, что различия между родительским и дочерним изолятами ХВШ являются результатом адаптационных изменений, произошедших в вирусном геноме.

Полученные в настоящей работе данные о различных уровнях накопления мутаций в разных районах генома ХВШ показывают, что функциональные модули вирусного РНК-генома могут испытывать неодинаковое давление естественного отбора и, как следствие, эволюционировать с разной скоростью.

Высокий уровень изменчивости, обнаруженный для района генома ХВШ, который кодирует белки ТБГ, необходимые для межклеточного транспорта вирусной инфекции, и белок р42, вероятно, говорит о том, что последний белок также может быть связан с какими-либо аспектами вирусного транспорта.

Это не противоречит имеющимся экспериментальным данным о взаимодействии белка р42 с вирионами, поскольку для некоторых вирусов, не относящихся к роду *Allexivirus*, показано, что взаимодействие вирус-специфических белков, не входящих в состав спирального капсида, с вирусными частицами необходимо для транспорта вирусной инфекции.

Причиной наблюдаемых изменений, вероятно, является адаптация к новому растению-хозяину.

2. Исследование супрессорной активности белков кодируемых 3' - областью генома X вируса шалота

Эффективной стратегией, выработанной фитопатогенными вирусами в ходе эволюции и позволяющей им преодолевать действие РНК-интерференции, является блокирование генетического сайленсинга посредством специальных белков – супрессоров РНК интерференции. Таким образом, идентификация белков X вируса шалота с предполагаемой супрессорной активностью, способствовала бы пониманию природы молекулярных механизмов используемых ХВШ для репродукции в зараженных растениях.

Исследование возможного наличия функции супрессии РНК-интерференции у ряда белков, кодируемых геномом X вируса шалота, проводилось с помощью агробактериальной транзientной экспрессирующей системы репортерного белка (зеленого флуоресцирующего белка, GFP) в листьях табака (*N. Benthamiana*) в присутствии специфического индуктора РНК-интерференции и известного или предполагаемого вирусного супрессора.

Использование данной технологии включает создание вектора на основе бинарной плазмиды, несущей вставку полноразмерной копии амплифицируемых участков, соответствующих генам белков экспрессируемых X вирусом шалота.

При конструировании праймеров для амплификации индивидуальных фрагментов вирусной кДНК и последующего клонирования их в бинарный вектор были использованы данные актуальной информации о геномной организации X вируса шалота настоящего исследования, а также информация, полученная нами и другими исследователями ранее.

С целью клонирования отдельных фрагментов вирусной кДНК в бинарный вектор, в структуру праймеров были включены последовательности сайтов рестрикции NcoI и XbaI, отсутствующие в последовательностях исследуемых фрагментов. Кроме того, в последовательность праймеров с сайтом рестрикции NcoI после иницирующего кодона и следующего за ним гуанилового остатка включали динуклеотид TG. Возникающий таким образом триплет GTG индуцировал включение в соответствующие полипептиды после N-концевого метионина остатка валина, не влияющего на активность белка *in vivo*.

Полученные последовательности содержали фланкирующие сайты рестрикции, иницирующий кодон и соответствующие открытые рамки считывания (без сайтов NcoI и XbaI), то есть все элементы, необходимые для клонирования в бинарный вектор и дальнейшего использования в системе агробактериальной транзientной экспрессии исследуемых белков.

Библиотеки плазмид, содержащих вставку с данными последовательностями, могут быть использованы в дальнейших молекулярно-биологических экспериментах с X вирусом шалота.

При исследовании локального сайленсинга, листья интактных растений *N. benthamiana* инокулировали суспензией клеток агробактерий, трансформированных рекомбинантными плазмидами, несущими генетические конструкции. Уровень экспрессии репортерного гена оценивали по результатам иммуоблотинга и флуорометрии экстрактов экспериментальных растений по прошествии 7 дней после инъекции.

Агроинъекцию *Nicotiana benthamiana* осуществляли в следующих вариантах:

1. Репортерный ген (GFP) + пустой вектор; 2. GFP + индуктор РНК интерференции (dsGFP) + пустой вектор; 3. Известный супрессор (p19) + dsGFP + репортерный ген; 4,5,6,7 Последовательность, кодирующая исследуемый белок + индуктор РНК интерференции (dsGFP) + репортерный ген.

Шпилечная структура, образующаяся при экспрессии конструкции V-dsGF, является индуктором РНК сайленсинга и при ее наличии экспрессия маркерного белка GFP не происходит, тогда как присутствие белка-супрессора, P19, ингибирует данный процесс, что позволяет GFP экспрессироваться в растениях табака. Соответственно наличие экспрессии GFP в вариантах 5-8, может подтвердить функцию супрессора РНК сайленсинга у какого-либо из исследуемых нами белков 3' области ХВШ. В случае если исследуемый белок не обладает супрессорной функцией, маркерный белок GFP экспрессироваться не будет, за счет действия индуктора РНК сайленсинга экспрессируемого конструкцией V-dsGFP.

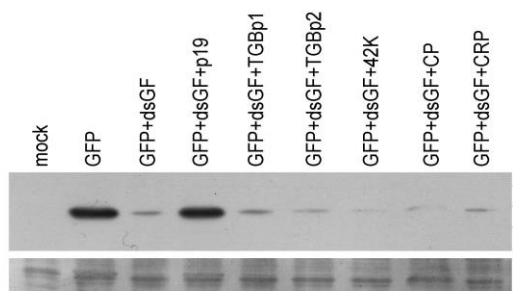
Как следует из результатов, представленных на рис. 2 а и б, восстановление уровня экспрессии GFP, сниженного в результате действия конструкции V-dsGF наблюдается только в присутствии белка-супрессора томбусвирусов (конструкция V-p19). При этом, ни один из протестированных белков ХВШ функцией супрессора локального РНК-сайленсинга не обладает.

При изучении системного сайленсинга использовалась конструкция экспрессирующая TGBp1 белок ХВШ (ORF2), потекс- и карлавирусные гомологи которого обладают функциями супрессора РНК-интерференции. Суспензию клеток агробактерий, несущих конструкцию V- ShVX-ORF2, инъецировали в листья нижнего яруса трансгенных растений *Nicotiana benthamiana* линии 16с экспрессирующих зеленый флуорисцентный белок медузы (GFP), и через 14 - 16 дней интенсивность флуоресценции GFP в листьях верхнего яруса оценивали методом флуорометрии (Рис. 2 в).

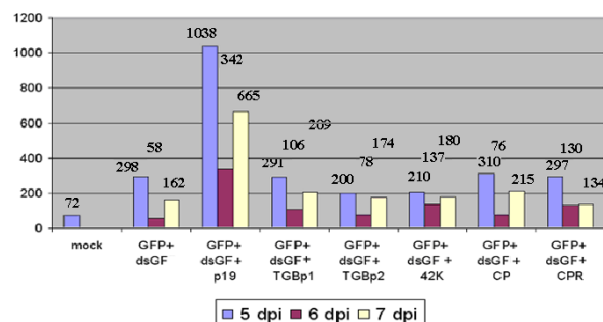
Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что в отличие от своих потекс- и карлавирусного гомологов, TGBp1 белок ХВШ (ORF2) не ингибирует также и системный РНК - сайленсинг.

Таким образом, результаты настоящего исследования позволяют сделать вывод, что ХВШ репродуцируется в растениях шалота в отсутствие собственного активного белка-супрессора РНК сайленсинга. Не исключено, что ингибирование РНК сайленсинга, необходимое для успешной репродукции ХВШ в исследуемой системе, может быть обусловлено различными механизмами, например способностью вируса каким-то образом полностью подавлять или изменять экспрессию генов антивирусного фитоиммунитета.

А.



Б.



В.

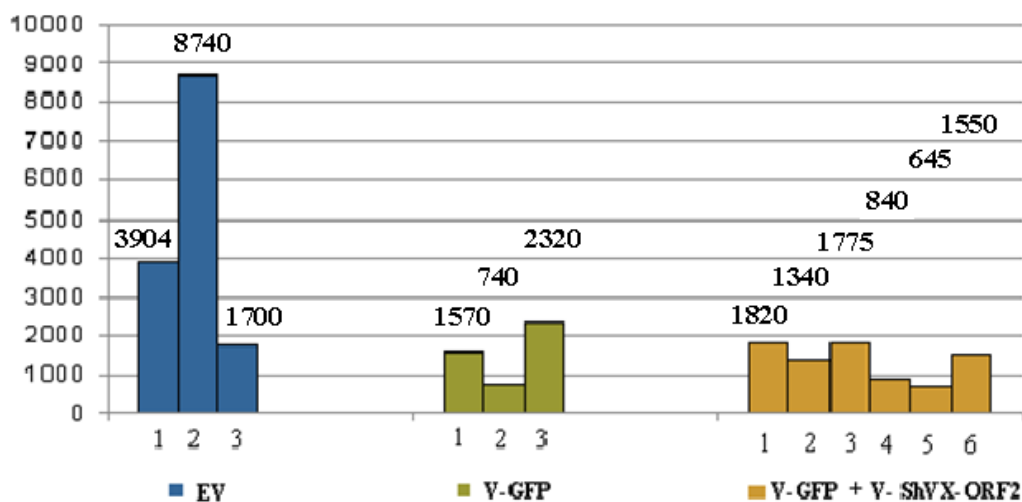


Рисунок 2. Детекция GFP методами иммуноблотинга и флуорометрии.

(А) Иммуноблотинг экстрактов листьев *N. Benthamiana* через 4 дня, после инъекции клетками агробактерий, несущих генетические конструкции для проверки супрессорной активности белков 3' области ХВШ;

(Б) Флуорометрия экстрактов листьев *N. Benthamiana* через 5, 6 и 7 дней после инъекции клеток агробактерий, несущих генетические конструкции для проверки супрессорной активности белков 3' области ХВШ.

(В) Флуорометрия экстрактов листьев GFP-трансгенной *N. benthamiana* (линия 16 с) через 14 дней после инъекции клеток агробактерий, трансформированных рекомбинантной плазмидой, несущей конструкцию ShVX-ORF2.

Флуоресцентный спектрометр LS 55, PerkinElmer. Значения светового потока при отношении Excitation/ Emission = 395/509, обозначены жирным шрифтом.

3. Подавление экспрессии факторов РНК-сайленсинга при репродукции ХВШ

Фитовирусная инфекция в растениях является мощным экзогенным индуктором РНК-интерференции – эффективного механизма антивирусного фитоиммунитета.

Данные, полученные в настоящей работе, дают основания предполагать, что ХВШ успешно репродуцируется в отсутствие собственного активного белка-супрессора и, следовательно, преодолевает иммунный барьер РНК-сайленсинга с помощью каких-то иных молекулярных механизмов.

В настоящей работе была поставлена задача экспериментальной проверки гипотезы, согласно которой ХВШ предотвращает РНК-сайленсинг в результате специфического ингибирования транскрипции генов дайсер-подобных белков (DCL) и РНК-зависимой РНК полимеразе (RDR), что предполагает сравнительное исследование уровней представленности соответствующих транскриптов в корнях и листьях здоровых и инфицированных ХВШ растений шалота.

До проведения настоящего исследования какая-либо информация об уровнях экспрессии данных белков *Allium cepa var. aggregatum G. Don* в мировой научной литературе отсутствовала.

На первом этапе работы основную задачу идентификации дайсер-подобных белков шалота в настоящем исследовании предполагалось решить с помощью диагностических праймеров, соответствующих консервативным участкам геномных последовательностей DCL - белков арабидопсиса.

В наших экспериментах, с помощью указанных праймеров, были надежно идентифицированы DCL-белки 1-4 в растениях арабидопсиса, однако применение их на ядерной ДНК или кДНК шалота оказалось безуспешным. Ампликоны либо не синтезировались вовсе, либо продукты реакции не обладали сколько-нибудь выраженной гомологией с последовательностями, кодирующими DCL-белки 1-4.

Мы интерпретировали эти данные как свидетельство выраженной дивергенции генов DCL-белков *A. thaliana* и *Allium cepa var. aggregatum G. Don*.

В связи с этим мы предприняли попытку подойти к решению стоящей перед нами задачи, используя базу данных GarlicESTdb, содержащую информацию о 21,595 EST (Expressed Sequence Tags) – последовательностях *Allium sativum*. Использование в аналогичных целях базы данных по *Allium cepa* содержащей значительно меньшее число EST-последовательностей, оказалось безуспешным.

В результате этой работы из базы данных GarlicESTdb были выбраны три EST-последовательности: EPP005KGAA12S003959 (783 bp), EPP004KGAA12S004834 (679 bp) и EPP004KGAA12S005240 (675bp). Все они содержали по одной открытой рамке считывания, и степень гомологии, транслируемых с этих последовательностей полипептидов с различными DCL-белками арабидопсиса, риса и тополя варьировала в пределах 60-70%. При этом соответствующий компьютерный анализ выявил в составе исследуемых полипептидных цепей характерные для молекулы DCL-белка dsRNA bind, PAZ и RIBOc (RNase IIIa и RNase IIIb) домены.

Разработанные на основе полученной информации праймеры, соответствующие участкам трех выбранных EST-последовательностей, были использованы для дальнейшей работы с транскриптомом шалота.

Ампликоны, полученные при проведении обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с данными праймерами, экстрагировали из геля, очищали и секвенировали.

Компьютерный анализ полученных последовательностей не выявил заметной гомологии с представленными в базах данных NCBI последовательностями DCL иных видов, в то же время транслируемые с этих последовательностей полипептиды обладали высоким уровнем гомологии со всеми растительными дайсер-подобными белками и наибольшим (81%) - с DCL-белками тополя (*Populus trichocarpa*).

При этом аминокислотные последовательности всех трех полипептидов не были идентичными, в то же время в структуре каждого присутствовали различные, характерные для молекулы DCL- белков домены (dsRNA bind, PAZ или RIBOc).

Таким образом, впервые представлено доказательство экспрессии в растениях шалота нуклеотидных последовательностей, кодирующих три домена различных дайсер-подобных белков; кроме того, представленные данные позволяют сделать вывод о высокой степени дивергенции дайсер-подобных белков арабидопсиса и ряда других видов относительно *Allium cepa var. aggregatum G. Don.*

При идентификации нуклеотидных последовательностей, кодирующих белки RDR в растениях шалота, использовался подход, апробированный нами для поиска нуклеотидных последовательностей DCL. Аналогичный метод использовался для поиска последовательности 18s РНК шалота.

С использованием баз данных NCBI *Allium cepa* ESTdb (taxid:4679) и NCBI *Allium sativum* ESTdb (taxid:4682) были выбраны EST-последовательности, степень гомологии которых с различными последовательностями растительных RDR (EST677423, EST683932, EST672667) и 18s РНК (EST682433, 687635) варьировала в пределах 70-90%.

Компьютерный анализ последовательностей к-ДНК шалота, полученных с праймерами разработанными на основе установленных EST-последовательностей, выявил заметный процент гомологии с представленными в базе данных NCBI; для нуклеотидных последовательностей RDR сходство составляло 67-73%, для 18s rRNA 73-74%.

Поскольку обнаруженные в растениях шалота нуклеотидные последовательности кодируют полипептиды, обладающие наиболее высоким уровнем гомологии (>98%) с RDR6 арабидопсиса и риса, можно полагать, что полученная в работе информация отражает ситуацию именно с этим классом РНК-полимераз. Таким образом, впервые представлены доказательства экспрессии в растениях шалота нуклеотидных последовательностей, кодирующих растительную РНК зависимую полимеразу. Праймеры разработанные в ходе настоящей работы могут быть рекомендованы для дальнейших молекулярно-биологических исследований соответствующих последовательностей *Allium cepa var. aggregatum G. Don.*

Исследование уровней представленности транскриптов, кодирующих DCL-белки и RDR в листьях инфицированных растений, проводили в период, когда концентрация вируса достигала своего максимума (2-3 недели после высадки луковиц); в корнях этот параметр исследовали на 4-5 день после высадки луковиц (стадия ювенильных листьев) и затем - через 2 – 3 недели роста растений.

Конструирование праймеров, использованных в настоящей работе при проведении полимеразной цепной реакции в реальном времени было осуществлено на основе установленных нами последовательностей кодирующих DCL, RDR и 18s РНК в *Allium cepa var. aggregatum G. Don.*, таким образом, что бы расчетный размер ампликона соответствовал оптимальному диапазону 100-200bp. Праймеры, амплифицирующие фрагмент последовательности кодирующей липидпереносящий пептид, были сконструированы непосредственно на основе известной последовательности LTP 4 шалота (AllTP4, GenBank Accession EF633511).

Набор праймеров генерировали с помощью программы Primer3 v.4.1.0.

Выбор оптимальных праймеров осуществляли методом полимеразной цепной реакции по конечной точке.

Уровни представленности транскриптов, кодирующих белки-мишени в исследуемых образцах, определяли методом ПЦР в реальном времени; алгоритм delta-delta CT; калибратор – безвирусные сеянцы шалота; нормалайзер – 18S РНК. Амплификатор – Lightcycler 96 («Roche Diagnostics GmbH», Германия), набор реагентов SYBR® Green Reagents (ОАО «Синтол», Москва).

Как следует из результатов, представленных на Рис.3, в корнях инфицированных растений шалота уже на 4 день после высадки луковиц (Рис.3, А) было выявлено значительное подавление экспрессии RDR и DCL, и через две недели роста растений экспрессия генов-мишеней оказывалась подавленной полностью (Рис.3, Б). В листьях максимальный уровень подавления экспрессии DCL – белков составлял 40- 60%, тогда как уровень экспрессии RDR снижался на 98% (Рис.3, В).

Напротив, уровень экспрессии липидпереносящего пептида 4 в корнях и листьях двухнедельных инфицированных растений шалота, в отличие от RDR и DCL, заметно возрастает (Рис.3, Б и В).

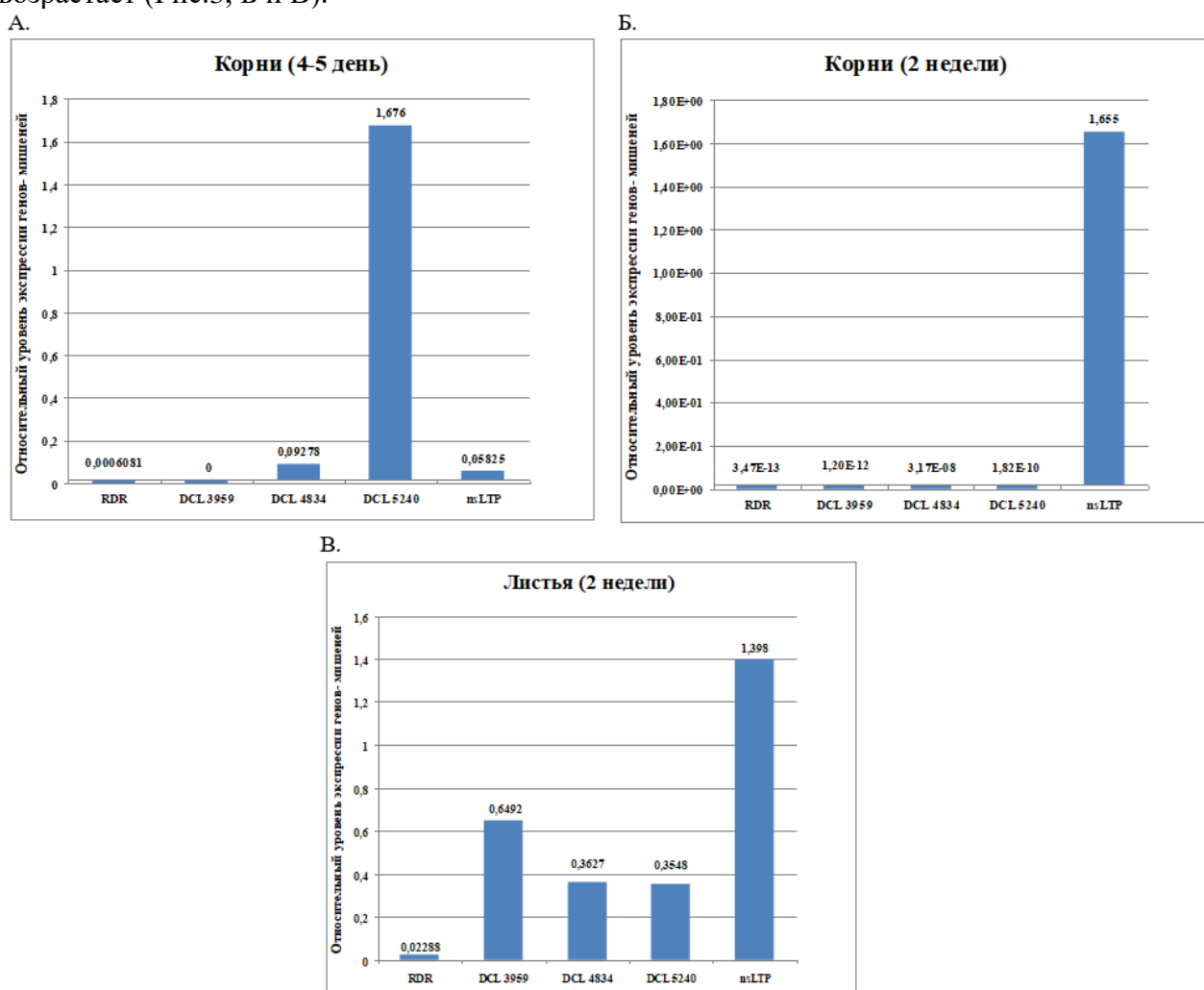


Рисунок 3. Относительные уровни экспрессии генов-мишеней в корнях (А, Б) и листьях (В) растений шалота в условиях персистентной инфекции ХВШ.

Вирусная инфекция весьма специфичным и сложным образом модифицирует структуру транскриптома восприимчивых или резистентных к данному вирусному штамму видов растений-хозяев, при этом изменяется уровень экспрессии сотен генов, контролирующих как обуславливающие антивирусный иммунитет факторы, так и неспецифические факторы, в частности, липидпереносящие пептиды.

В настоящей работе впервые описан феномен подавления транскрипции генов клеточной РНК-зависимой РНК-полимеразы и DCL-белков в корнях растений шалота в условиях персистентной инфекции ХВШ. Мы предполагаем, что способность вируса подавлять экспрессию ключевых факторов РНК-сайленсинга обеспечивает успешную репродукцию и формирование персистентной инфекции ХВШ в отсутствие собственного активного белка-супрессора.

4. Транскрипционное репрограммирование в процессе персистентной инфекции ХВШ

Полученные в настоящей работе результаты свидетельствовали, что инфекция ХВШ, сопряженная с подавлением экспрессии по меньшей мере двух факторов сайленсинга (DCL-белков и RDR) в корнях и листьях инфицированных растений, влияет и на неспецифические факторы антивирусного иммунитета, в частности липид-переносающий белок.

Мы предположили, что механизмом, в результате которого могут избирательно изменяться уровни экспрессии значительного ряда генов, кодирующих факторы антивирусного фитоиммунитета и таким образом, способствующим репродукции ХВШ в отсутствие активного белка-супрессора, может являться специфическое транскрипционное репрограммирование обусловленное РТИ.

Образцы проростков и листьев растений шалота (*Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don) размноженных в условиях персистентной инфекции ХВШ отбирали через 3 суток и через 2 недели после высадки луковиц.

Для анализа выбирались гены-маркеры РТИ (ARM; RBOHD; EDS5; LOX3; BR11; SOBIR; CRK4; SERK1; PR1; PR5; NHL10; ACRE31; ACRE132) и другие гены-мишени, задействованные в антивирусном фитоиммунитете (DCL; RDR 6; AGO; Tm22; PR6; LTP; WRKY; TCTP; PIRL; DBP1; CBP60g; GRF6; FRK1).

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 NCBI (Transcriptome Shotgun Assembly, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/tsa/>). Соответствие обнаруженных транскриптов искомым белкам-гомологам устанавливали с помощью программы blastx.

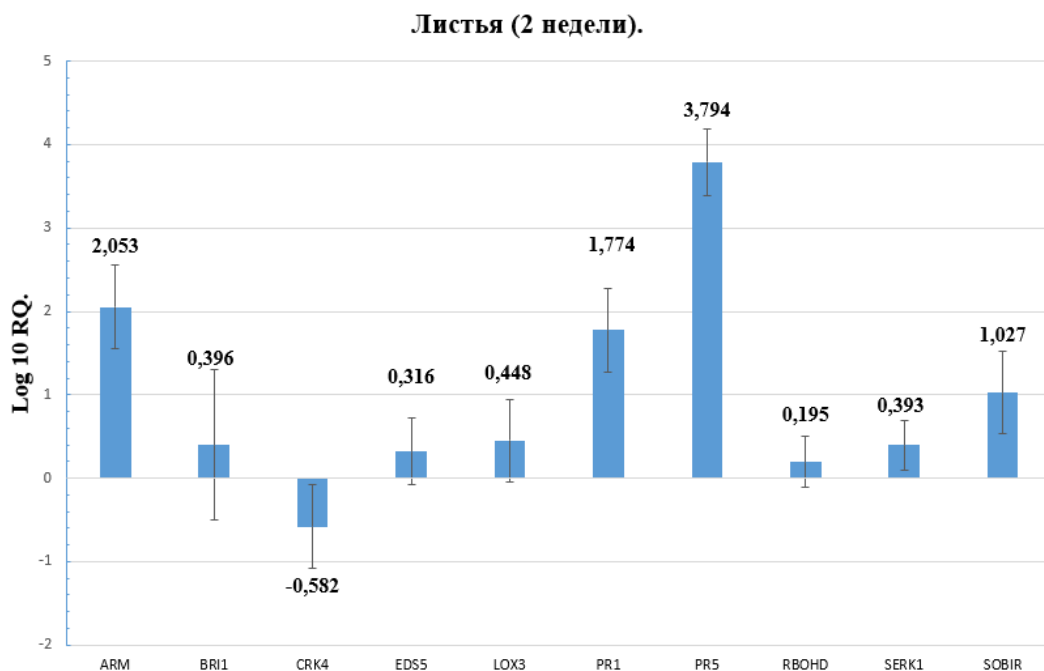
Уровни представленности транскриптов, кодирующих белки-мишени в исследуемых образцах, определяли, как это было описано для DCL и RDR, ранее, с тем отличием, что в данных экспериментах использовались амплификаторы 7500/7500 Fast Real-Time PCR Systems («Applied Biosystems», США).

Как следует из полученных результатов (рис. 4), в той или иной мере вирусная инфекция влияет на экспрессию всех исследованных генов-маркеров РТИ, однако при этом выявляется группа с очень высокой экспрессией и в листьях, и в корнях инфицированных растений (SOBIR, ARM, PR1, PR5). Следовательно, можно сделать вывод, что ХВШ в период инициирования инфекции взаимодействует с компонентами механизма РТИ и в результате индукции РТИ запускается процесс транскрипционного репрограммирования.

На начальной стадии инфекционного процесса в проростках (рис. 5, А) активировалась экспрессия всех генов-мишеней факторов фитоиммунитета (за исключением AGO и PIRL). Через 2 недели инфекции ситуация в целом изменялась на противоположную: в листьях подавлялась экспрессия большинства генов-мишеней, в том числе всех факторов РНК-сайленсинга (более других – белков-аргонавтов), трех маркеров РТИ, NB-LRR рецепторов и белков CBP60g, контролирующих синтез салициловой кислоты. На достаточно высоком уровне поддерживалась экспрессия только ACRE132 (маркера РТИ), липид-трансферных белков и комплекса TCTP+GRF6 (рис. 5, Б).

В корнях (рис. 6, А, Б) ингибирование экспрессии генов-мишеней отмечали уже на начальной стадии инфекционного процесса, а через 2 недели подавленной оказывается уже большая часть генов-мишеней, при этом экспрессия LTR снижалась незначительно.

А.



Б.

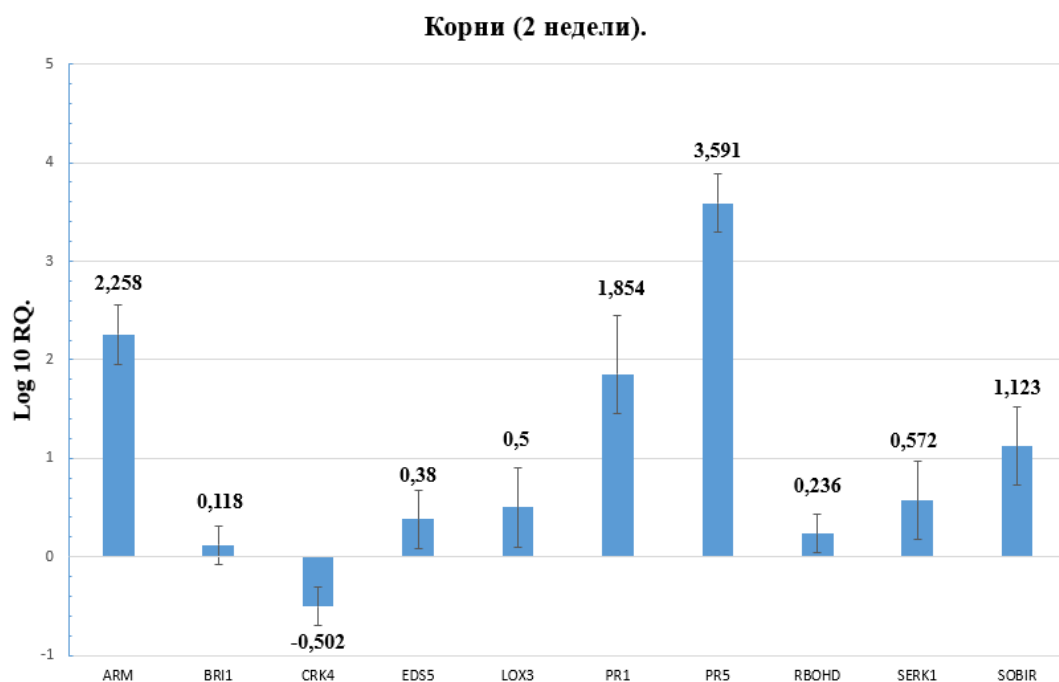


Рис 4. Представленность транскриптов генов-маркеров Pattern-Triggered Immunity (PTI) в листьях (А) и в корнях (Б) растений шалота (*Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don) при персистентной инфекции X вирусом шалота через 2 недели после высадки луковиц: RQ — Relative Quantification (изменения в экспрессии мРНК относительно величины для РНК внутреннего контроля).

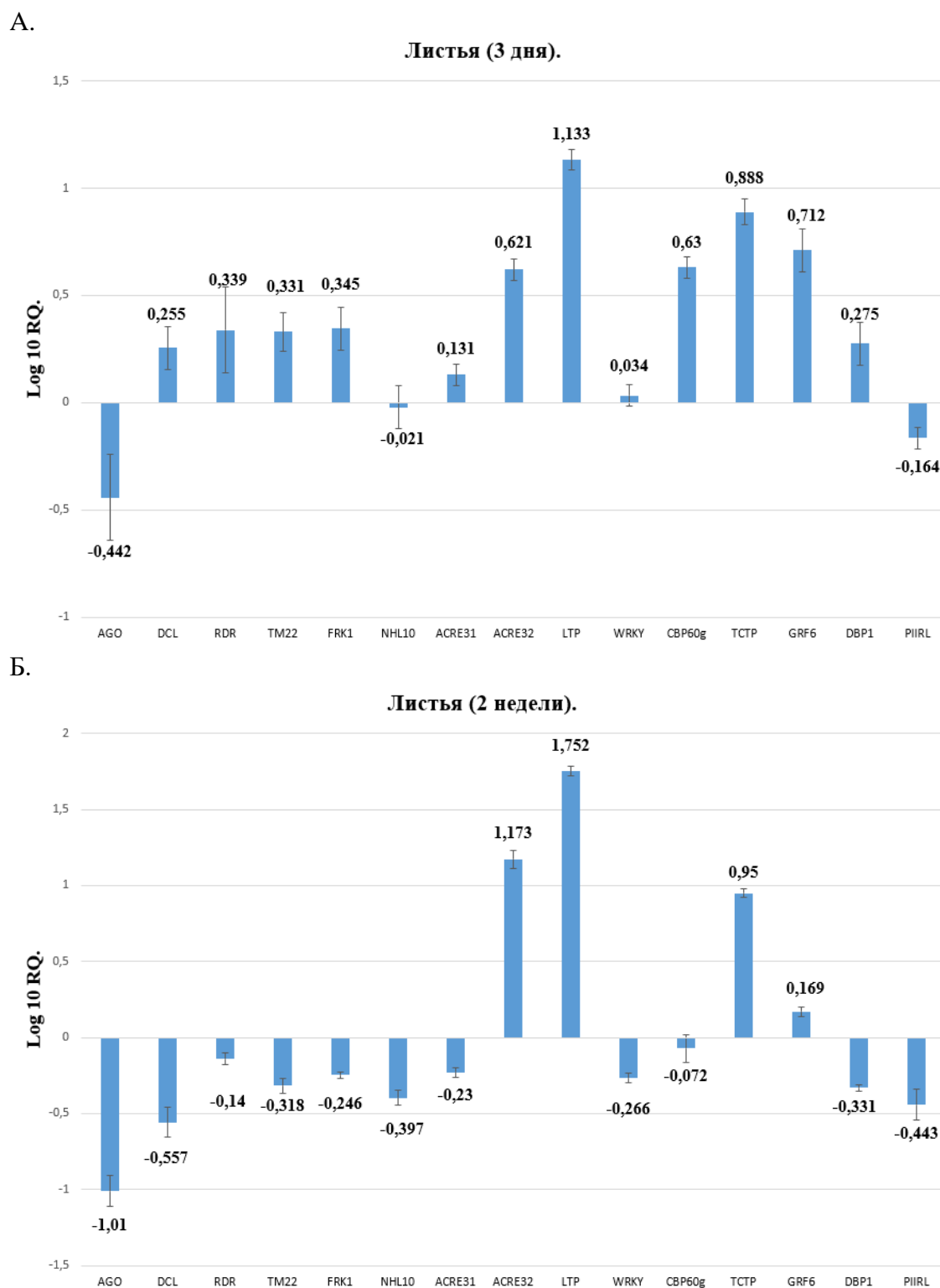


Рис. 5. Представленность транскриптов генов-мишеней факторов фитоиммунитета в надземных органах растений шалота (*Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don) на разных стадиях инфекции X вирусом шалота: А — проростки (3 суток после высадки луковиц), Б — листья (2 недели после высадки луковиц); RQ — Relative Quantification (изменения в экспрессии мРНК относительно величины для РНК внутреннего контроля).

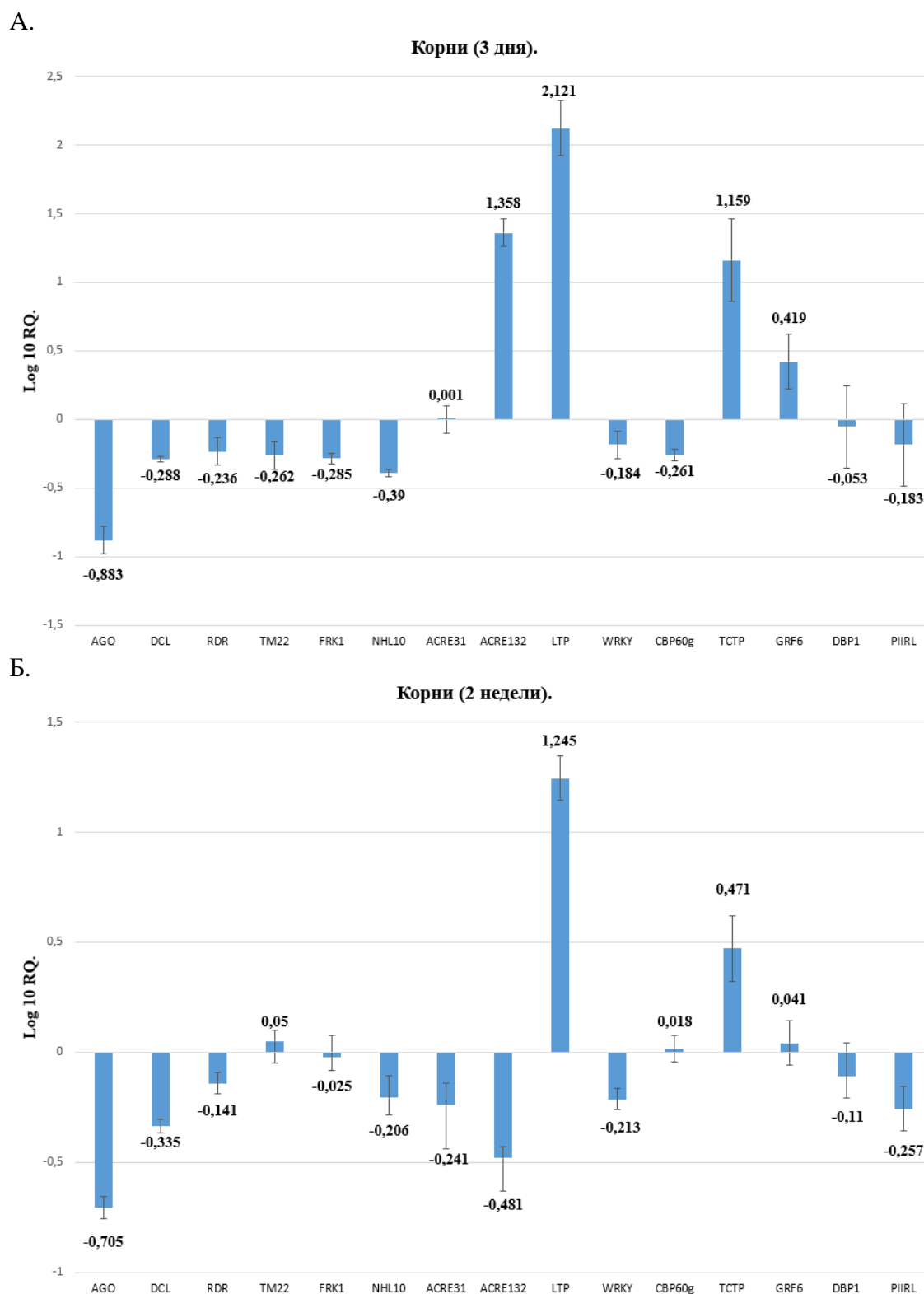


Рис. 6. Представленность транскриптов генов-мишеней факторов фитоиммунитета в корнях растений шалота (*Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don) на разных стадиях инфекции X вирусом шалота: А - 3 суток после высадки луковиц, Б - 2 недели после высадки луковиц; RQ - Relative Quantification (изменения в экспрессии мРНК относительно величины для РНК внутреннего контроля).

Из представленных результатов следует, что в условиях персистентной инфекции ХВШ индуцирует в корнях и листьях растений избирательное изменение экспрессии ряда генов-мишеней, включая гены кодирующие белки-маркеры РТИ, факторы РНК-сайленсинга, NB-LRR рецепторы, липид-трансферные белки, а также белки, принимающие участие в репликации вируса (ТСТР-комплекс), то есть ХВШ инициирует динамический процесс транскрипционного репрограммирования.

Проведенное исследование так же показало, что уровень экспрессии гена ARM в исследуемой патосистеме был существенно выше, нежели в безвирусных растениях.

Данный ген кодирует белок, принимающий участие в процессах антивирусной ксенофагии и РНК-распада (RNA-decay), что позволило нам предположить индуцирование персистентной вирусной инфекцией процессов аутофагии и изменений транскрипционных программ экспрессии ряда факторов контроля качества РНК (RQC, RNA Quality Control).

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 факторы аутофагии, участвующие в антивирусном иммунитете растений, изучены совершенно недостаточно.

С другой стороны, 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 контроля качества РНК (RQC, RNA Quality Control).

Поскольку вирусные РНК обладают рядом необычных, с точки зрения клетки, структурных особенностей, эти молекулы также атакуются механизмами RNA-decay, представляющими, таким образом мощный фактор антивирусного иммунитета.

В данной части работы мы исследовали изменения транскрипционных программ экспрессии ключевых факторов аутофагии (VPS15; ATG 2; ATG 3; ATG 4; ATG 5; ATG 6; ATG 8a; ATG 9; PI3K; UBQ11; NBR1; TRIM41; TRIM5 α ; MAPK) и RNA Quality Control (RRP41; RRP42; RRP43; RRP40; RRP6; CSL4; DCP1; DCP2; SGS3; XRN3; XRN4; UPF1) в условиях персистентной инфекции ХВШ.

Образцы проростков и листьев растений шалота (*Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don) размноженных в условиях персистентной инфекции ХВШ отбирали через 5, 15, 25, 35 и 50 дней после высадки луковиц.

Поиск нуклеотидных последовательностей, кодирующих гомологи выбранных генов-мишеней, проводили как это было описано для генов-маркеров РТИ.

Уровни представленности транскриптов, кодирующих белки-мишени в исследуемых образцах, определяли, как это было описано для DCL и RDR, ранее, с тем отличием, что в данных экспериментах использовались амплификаторы QuantStudio («Applied Biosystems», США).

Наиболее выраженным результатом изменения транскрипционных программ экспрессии факторов аутофагии в исследуемой системе является существенное увеличение экспрессии Atg8a и NBR1— ключевых факторов формирования аутофагосом (Рис.7).

Также наблюдается существенное увеличение уровней экспрессии декэпсирующего фактора DCP1 и XRN4 (5'-3' – экзорибонуклеазы), представляющего собой мощный эндогенный супрессор РНК-сайленсинга. При этом экспрессия классического эндогенного супрессора сайленсинга – SGS3, после незначительного повышения, существенно подавляется.

Одновременно 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.

Уровень экспрессии UPF-1- РНК-хеликазный комплекс (UPF-1 интерактом) участвующего в реализации одного из механизмов RQC, а именно нонсенс-опосредованного распада РНК (nonsense-mediated decay (NMD)) лишь в незначительной степени подвергается влиянию вирусной инфекции. По-видимому, в процессе персистентной вирусной инфекции характер экспрессии UPF-1-РНК-хеликазного комплекса (UPF-1 интерактома) каким бы то ни было кординальным образом не изменяется, за исключением универсальных декэппирующих факторов DCP1 и DCP2, участвующих во всех процессах RQC (Рис.8).

Вероятно, 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.

В процессе данного исследования были обнаружены и идентифицированы транскрипты, кодирующие комплекс факторов аутофагии и RNA-decay в растениях шалота, создана система специфических праймеров, позволяющих определять уровни представленности указанных транскриптов-мишеней методом полимеразной цепной реакции в реальном времени, определены уровни представленности транскриптов, кодирующих базовые факторы аутофагии и RQC на разных этапах персистентной вирусной инфекции шалота.

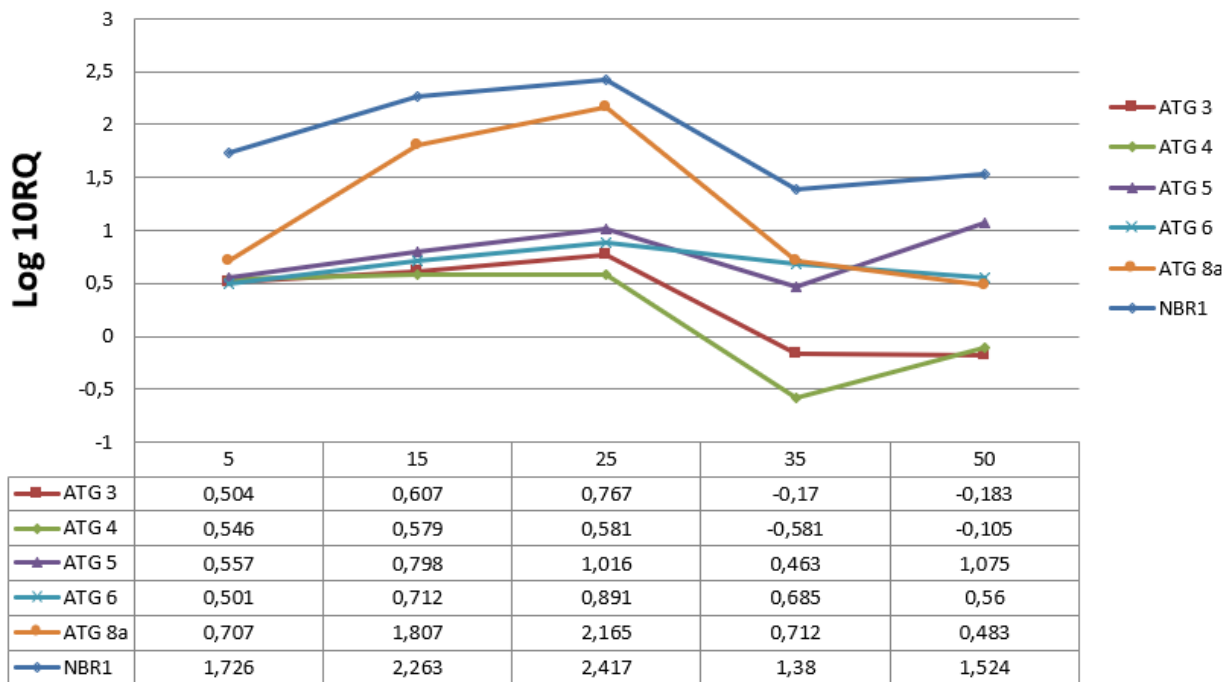
Результаты, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о том, что толерантная реакция растений шалота в условиях персистентной вирусной инфекции специфическим образом сопряжена с изменениями транскрипционных программ экспрессии базовых факторов врожденной иммунной системы.

В результате реализации рецепторных и сигнальных функций, присущих факторам фитоиммунитета, в растениях активируются многочисленные и разнообразные иммунные реакции, в то числе РНК-сайленсинг, механизмы аутофагии и RQC.

Мы полагаем, что индукция РТИ и обусловленное этим транскрипционное репрограммирование являются механизмами, общими для всех РНК-содержащих вирусов.

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.

A.



Б.

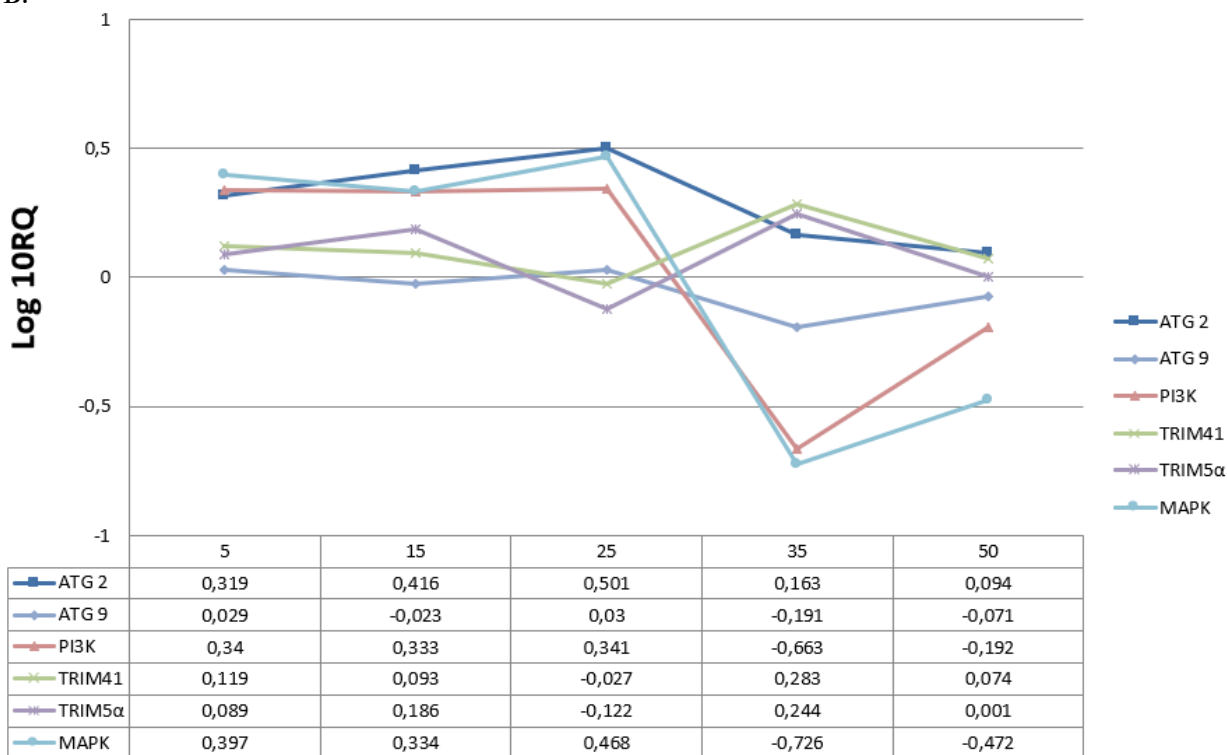
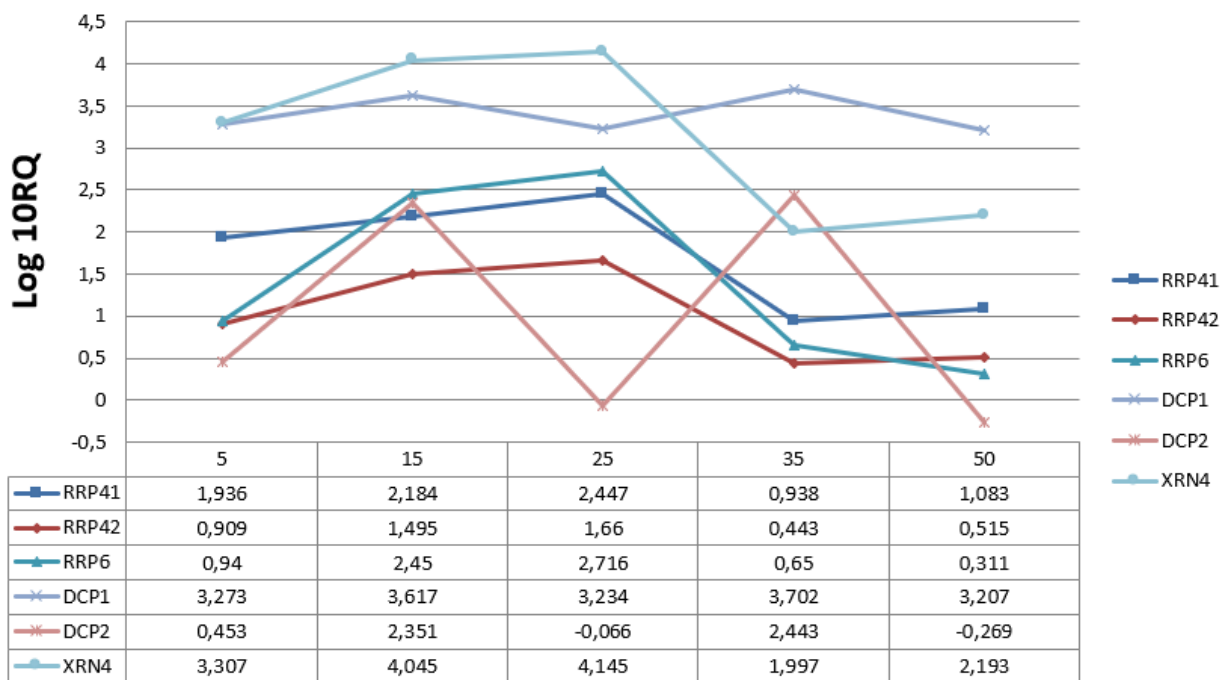


Рис. 7. Относительные уровни экспрессии факторов аутофагии в листьях растений шалота инфицированных ХВШ: А – NBR1, ATG 3-6, 8a; Б – ATG2 & 9, PI3K, TRIM41 & 5alpha, MAPK. На оси абсцисс указаны дни после высадки луковиц. RQ: Relative Quantity.

A.



Б.

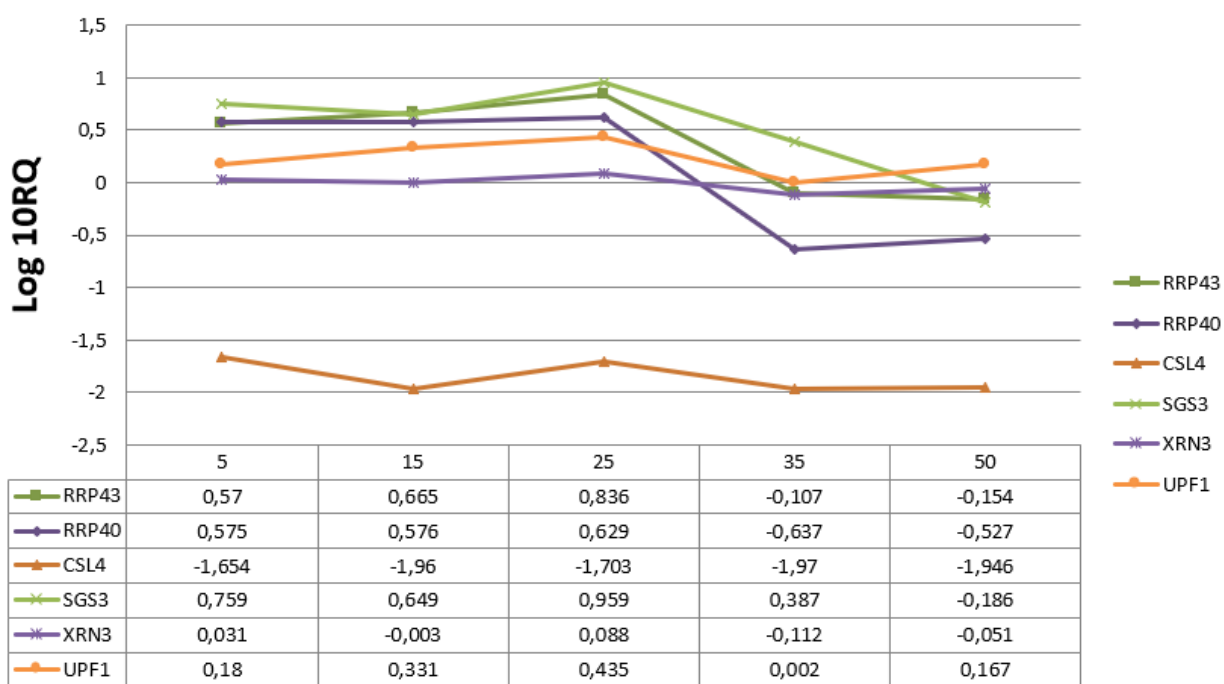


Рис. 8. Относительные уровни экспрессии факторов RQC в листьях инфицированных растений шалота: А – RRP 6, 41, 42, DCP 1 & 2, XRN4; Б – RRP 40 & 43, CSL4, SGS3, XRN3, UPF1. На оси абсцисс указаны дни после высадки луковиц. RQ: Relative Quantity.

5. Репродукция X вируса шалота в чесноке

В России продуктивная репродукция X вируса шалота, наблюдалась только в растениях *Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don и в литературе не встречалось сообщений о репродукции XВШ в иных видах растений. В нашем исследовании представлены данные, подтверждающие наличие вирионов XВШ в чесноке.

Листья тридцати образцов растений чеснока, как бессимптомных (10), так и с явно выраженными симптомами (20) (хлоротические полосы и скручивание листьев), были собраны в июле 2015 года в сельскохозяйственных посадках Алаузи, провинция Чимборасо (Alausí, Chimborazo Province). Семнадцать из тридцати образцов чеснока, протестированных методом Сэндвич-ELISA (double antibody sandwich ELISA) с использованием антител к ShVX (DSMZ AS-1042), показали положительную реакцию, при этом тринадцать объектов из образцов с положительной реакцией ELISA показывали изначально симптомы вирусной инфекции.

Из 100 мг листового материала десяти растений, определенных как зараженные предыдущим методом, выделяли тотальную РНК с использованием модифицированного протокола Trizol (Invitrogen, США) и анализировали методом ОТ-ПЦР на наличие генома ShVX.

При постановке ПЦР использовались вырожденные праймеры:

IAV-F: 5'-CYGCTAAGCTATATGCTGAARGG-3'

IAV-R: 5'-TGTTCAARGTAAGTTTAGYAATATCAACA-3'.

Получен ампликон ожидаемого размера около 200 пар оснований.

Дополнительную детектирующую ПЦР проводили с использованием сиквенс-специфических праймеров, разработанных для амплификации фрагмента, размером около 910 пар оснований SHVX, включающего ген белка оболочки:

ShVX-CPF: 5'-ATTTAGGGGTGAAGGTCTGT-3';

ShVX-CPR: 5'-GAGTTTTGAGGTCGTTGG-3'.

Ампликоны были непосредственно секвенированы из продуктов ПЦР и депонированы в генбанк (KY012791).

Эквадорский изолят ShVX показал 94% идентичность нуклеотидной последовательности с российским изолятом SHVX (JX310755.1) и от 92 до 94% с новозеландскими изолятами ShVX (EU835197.1, EU835196.1).

Исходя из полученных результатов впервые в мировой литературе подтверждено присутствие XВШ в Эквадоре и его репродукции в местных сельскохозяйственных культурах чеснока.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что функциональные модули вирусного РНК-генома ХВШ могут испытывать неодинаковое давление естественного отбора и, как следствие, эволюционировать с разной скоростью.

2. Сравнение полученной последовательности генома ХВШ с опубликованной ранее последовательностью родительского изолята, показало, что различия между родительским и дочерним изолятами ХВШ являются результатом адаптационных изменений, произошедших в вирусном геноме.

3. Показано, что ХВШ, по-видимому, репродуцируется в растениях шалота в отсутствие собственного активного белка-супрессора РНК сайленсинга.

4. При исследовании локального сайленсинга установлено что, ни один из протестированных белков ХВШ не обладает супрессорной активностью.

5. В экспериментах по изучению системного сайленсинга показано, что в отличие от своих потекс- и карлавирусного гомологов, TGBp1 белок ХВШ (ORF2) не ингибирует также и системный РНК - сайленсинг.

6. Впервые представлено доказательство экспрессии в растениях шалота нуклеотидных последовательностей, кодирующих три домена различных дайсер-подобных белков, РНК-зависимую РНК-полимеразу и 18s РНК.

7. Представленные данные указывают на высокую степень дивергенции дайсер-подобных белков арабидопсиса и ряда других видов, с одной стороны, и растений рода *Allium*, с другой.

8. Были обнаружены и идентифицированы транскрипты, кодирующие комплекс факторов участвующих в процессах РТИ, аутофагии, и RQC в растениях шалота, создана система специфических праймеров, позволяющих определять уровни представленности указанных транскриптов-мишеней методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

9. Успешная репродукция и формирование персистентной инфекции ХВШ в *Allium cepa var. aggregatum G. Don*, вероятно, обусловлены способностью вируса полностью или частично изменять экспрессию белков, задействованных в обеспечении противовирусного фитоиммунитета. Подавление экспрессии ключевых факторов РНК-сайленсинга в инфицированных растениях и, контролируемое во времени, избирательное изменение уровней экспрессии ряда генов-мишеней, кодирующих другие факторы противовирусного фитоиммунитета, обусловлено индукцией вирусом процесса РТИ.

10. Показана репродукция ХВШ в чесноке.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:

* Архипов А. В. Индукция РТИ (Pattern-Triggered Immunity) и транскрипционное репрограммирование при персистентной аллексивиральной инфекции / А.В. Архипов, В.К. Вишниченко // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53. – № 5. – С. 947-957.

* Архипов А. В. Персистентная инфекция X-вируса шалота сопряжена с подавлением транскрипции генов клеточной РНК-зависимой РНК-полимеразы и dcl-белков в корнях инфицированных растений / А.В. Архипов, А.Г. Соловьев, В.К. Вишниченко // Молекулярная биология. – 2017. – Т. 51. – № 1. – С. 126–130.

* Архипов А. В. Накопление изменений в геноме X вируса Шалота персистирующего в вегетативно размножаемых растениях / А.В. Архипов, В.А. Гущин, В.К. Вишниченко, А.Г. Соловьев // Доклады Академии Наук. – 2013. – Т. 452. – № 2. – С. 1–4.

* Архипов А. В. Репродукция X вируса шалота в отсутствие собственного активного белка-супрессора РНК сайленсинга / А.В. Архипов, А.Г. Соловьев, В.К. Вишниченко // Доклады РАСХН. – 2013 – Т. 2. – С. 14–17.

* Архипов А. В. Обнаружение нуклеотидных последовательностей, кодирующих DCL-белки в растениях шалота *Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don / А.В. Архипов, В.К. Вишниченко // Сельскохозяйственная биология. – 2011. - № 5 – С. 51–55.

Статьи в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных:

* Granda R. First report of Shallot virus X (ShVX) in garlic in Ecuador / R. Granda, G. Landázuri, **A.V. Arkhipov** // Plant Disease. – 2017. – V. 101. – № 6. – P.1066.

Статьи в сборниках конференций:

* Архипов А. В. Молекулярные механизмы толерантности растений к вирусным патогенам: изменения транскрипционных программ экспрессии факторов аутофагии и RQC (RNA quality control) в процессе персистентной аллексивиральной инфекции. / А.В. Архипов, В.К.Вишниченко / Международная научно-практическая конференция «Иммунитет растений к инфекционным заболеваниям», посвященной 100-летию монографии Н.И. Вавилова, Москва // Аграрная наука. – 2019. – Т. 2. – № 5. – С. 50-56.

* Архипов А. В. Изменения транскрипционных программ экспрессии факторов врожденной иммунной системы растения-хозяина в условиях персистентной вирусной инфекции. / А.В. Архипов, В.К.Вишниченко // Материалы VIII научно-практической конференции с международным участием. Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции. – Ростов-на-дону. – 2019. – С. 64-65.

* Архипов А. В. Индукция рti (pattern-triggered immunity) и транскрипционное репрограммирование в процессе персистентной аллексивиральной инфекции. // Сборник XVII молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева. – Москва. – 2017. – С. 19-22.

* Архипов А. В. Эволюция генома X вируса шалота (род Alexivirus), персистирующего в вегетативно размножаемых растениях *Allium cepa* var. *aggregatum* G. Don. в условиях моноинфекции. // Сборник XIII молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева. – Москва. – 2013. – С. 7-8.

* Архипов А. В. Исследование супрессорной активности 42K белка X вируса шалота. // Сборник IX молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева. – Москва. – 2009.