

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ ИМ. Н.И. ВАВИЛОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ЕРШОВА Наталия Михайловна

**РОЛЬ ГОМОЛОГА ИНГИБИТОРА ПЕПТИДАЗ КУНИТЦА
Nicotiana benthamiana В СИСТЕМЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ
ВИРУС-РАСТЕНИЕ**

1.5.3 – Молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель

д.б.н. Комарова Татьяна Валерьевна

Москва – 2025

Оглавление	
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	6
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
Развитие вирусной инфекции и внутриклеточные изменения.....	11
Стратегии защиты растения при вирусной инфекции	12
Врожденный иммунитет растения	12
Вирусный ЕТІ.....	14
Вирусный РТІ.....	21
Протеасомная деградация	24
Рецессивная устойчивость	27
РНК интерференция	29
Вирусные супрессоры РНКи	32
Клеточные факторы в системе взаимодействий вирус-растение	34
Белки цитоскелета.....	38
Белки мембранных контактных сайтов	42
Белок <i>N. tabacum</i> , содержащий анкириновые повторы	46
Шапероны и шаперон-подобные белки.....	46
Киназы	49
Пектинметилэстеразы.....	50
Non-cell-autonomous pathway protein (aldose 1-epimerase-like protein).....	51
Обратимо гликозилируемые полипептиды	52
Роль хлоропластов в регуляции межклеточного транспорта.....	53
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	56
РЕЗУЛЬТАТЫ	61
Анализ уровня экспрессии <i>NbKPILP</i> в условиях системной инфекции X вируса картофеля и тобамовирусов, ВТМ и крВТМ.....	61
Создание модельной системы для анализа функций <i>NbKPILP</i> при взаимодействии вирус-растение	62
Исследование влияния повышенной экспрессии <i>NbKPILP</i> на физиологический статус растения <i>N. benthamiana</i> , системно инфицированного ХВК	64
<i>NbKPILP</i> участвует в регуляции передачи ретроградных сигналов от хлоропластов в ядро.....	64
<i>NbKPILP</i> участвует в регуляции углеродного метаболизма	67
<i>NbKPILP</i> участвует в регуляции отложений каллозы вокруг плазмодесм	68
Выявление роли <i>NbKPILP</i> в регуляции ближнего транспорта и репродукции ВТМ и крВТМ.....	69
Исследование влияния <i>NbKPILP</i> на развитие системной инфекции ВТМ и крВТМ.....	76
ОБСУЖДЕНИЕ	79
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	86
БЛАГОДАРНОСТИ	88
БИБЛИОГРАФИЯ	88

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БО – белок оболочки

дцРНК, dsRNA – двухцепочечная РНК

МКС – мембранный контактный сайт

ПД – плазмодесма

ТБ – транспортный белок

ТФ – транскрипционный фактор

ЭР – эндоплазматический ретикулум

ADVPRP – белки атипичной доминантной вирусной устойчивости (atypical dominant viral resistance protein)

AGO – белок Argonaute

Avr – фактор авирулентности

BAK1 – BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1)-ASSOCIATED KINASE 1

BiFC – бимолекулярная комплементация флуоресценции

BiP5 – luminal-binding protein 5

CC-NB-LRR – coiled-coil nucleotide-binding leucine-rich repeat

CRS – ретроградная сигнальная система хлоропластов (chloroplast retrograde signaling)

DAMP – молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (damage-associated molecular patterns)

DCL — эндорибонуклеазы, содержащие домен РНКазы III (Dicer-like protein)

DRB – белок, связывающий дцРНК (DOUBLE-STRANDED RNA BINDING)

EDS1/PAD4/SAG101 – белковый модуль, состоящий из EDS1 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1), PAD4 (PHYTOALEXIN DEFICIENT4) и SAG101 (SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101)

ERAD – ЭР-ассоциированная деградация (endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation)

ETI – иммунитет, запускаемый эффекторами (effector-triggered immunity)

ETS – чувствительность к патогенам, вызванная эффекторами (effector-triggered susceptibility)

HR – гиперчувствительный ответ

HSP90/RAR1/SGT1 – белковый модуль, состоящий из SGT1 (SUPPRESSOR OF THE G2 ALLELE OF SKP1), RAR1 (REQUIRED FOR MLA12 RESISTANCE1) и HSP90 (HEAT SHOCK PROTEIN90)

HEN1 – метилтрансфераза HUA ENHANCER1

ЖК – жасмоновая кислота

LMR – устойчивость, обусловленная лектинами (lectin-mediated resistance)

MAMP – молекулярные паттерны, ассоциированные с микроорганизмами (microbe-associated molecular pattern)

MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase

NCAP – неклеточный автономный белок (non-cell autonomous protein)

NRIP1 – белок, взаимодействующий с N-рецептором (N RECEPTOR-INTERACTING PROTEIN1)

ONPS – система передачи сигналов между органеллами, ядром и плазмодесмами (Organelle-Nucleus-Plasmodesmata Signaling)

PAMP – молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами (pathogen-associated molecular pattern)

PhANG – ядерные гены, ассоциированные с фотосинтезом (photosynthesis-associated nuclear genes)

PR – гены, связанные с патогенезом (pathogenesis-related genes)

PTI – иммунитет, активируемый PAMP (PAMP-triggered immunity)

PTGS – посттранскрипционное у молкание генов (post-transcriptional gene silencing)

PRR – рецептор, узнающий PAMP/MAMP (pattern recognition receptor)

R – фактор резистентности

R-CoF – белок-кофактор фактора резистентности

RDR – эндогенные РНК-зависимые РНК полимеразы

RdRp – вирусная РНК-зависимая РНК полимераз

RISC – индуцируемый РНК комплекс сайленсинга (RNA-induced silencing complex)

RLK – рецептор-подобная киназа (receptor-like kinase)

RLP – рецептор-подобный белок (receptor-like protein)

АФК – активные формы кислорода

СК – салициловая кислота

SAR – приобретенная системная устойчивость (systemic acquired resistance)

siRNA – малые интерферирующие РНК

sRNA, small RNA – малые РНК

SPL6 – SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 6

TGS – транскрипционное у молкание генов (transcriptional gene silencing)

TIR-NB-LRR – Toll/interleukin 1 receptor-like nucleotide-binding leucine-rich repeat

vsRNA – siRNA, образованные на основе РНК вируса (virus-derived small interfering RNA)

VSR – вирусный супрессор сайленсинга (viral suppressors of RNA silencing)

Ub – убиквитин

UPR – ответ на некорректно уложенные белки (unfolded protein response)

UPS – система убиквитин-зависимой деградации в протеасоме (ubiquitin proteasome system)

VIGS – сайленсинг генов, индуцируемый вирусом (virus-induced gene silencing)

VRC – вирусный репликативный комплекс (Viral replication complex)

СПИСОК НАЗВАНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ ВИРУСОВ

BTM (TMV) – вирус табачной мозаики (tobacco mosaic virus)

крBTM (crTMV) – BTM крестоцветных (crucifer-infecting tobamovirus)

ХВК (PVX) – X вирус картофеля (potato virus X)

AV-3 – вирус аспарагуса 3 (asparagus virus 3)

CMV – вирус огуречной мозаики (cucumber mosaic virus)

ORMV – вирус мозаики рапса (oilseed rape mosaic virus)

PLAMV – вирус мозаики подорожника азиатского (plantago asiatica mosaic virus)

PLRV – вирус скручивания листьев картофеля (potato leafroll virus)

РММoV – вирус мягкой крапчатости перца (pepper mild mottle virus)

PPV – вирус оспы сливы (plum pox virus)

PVA – вирус картофеля A (potato virus A)

TBSV – вирус кустистой карликовости томатов (tomato bushy stunt virus)

TCV – вирус морщинистости турнепса (turnip crinkle virus)

TEV – вирус гравировки табака (tobacco etch virus)

TMGMV – вирус мягкой зеленой мозаики табака (tobacco mild green mosaic virus)

ToBRFV – вирус коричневой морщинистости плодов томатов (tomato brown rugose fruit virus)

ToMMV – вирус крапчатой мозаики томата (tomato mottle mosaic virus)

ToMV – вирус мозаики томата (tomato mosaic virus)

TVCV – вирус просветления жилок турнепса (turnip vein-clearing virus)

TYLCV – вирус желтой курчавости листьев томата (tomato yellow leaf curl virus)

TYMV – вирус желтой мозаики турнепса (turnip yellow mosaic virus)

TuMV – вирус мозаики турнепса (turnip mosaic virus)

WCMV – вирус мозаики белого клевера (white clover mosaic virus)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы. Растения постоянно подвергаются неблагоприятным воздействиям в среде своего роста и развития, сталкиваясь со множеством стрессовых факторов абиотического (температурные колебания, дефицит воды, высокие концентрации солей и др.) и биотического (бактерии, вирусы, грибы и др.) происхождения. Стресс, в частности, биотический (атака патогенов), запускает защитные реакции, такие как иммунные ответы, РНК интерференция (РНКи) или иные. В рамках такого ответа радикально меняется паттерн экспрессии генов и изменяется белковый состав клетки: одни белки подвергаются деградации, а другие накапливаются в клетке, или начинают выполнять другие функции в рамках патогенеза, менять свою локализацию, взаимодействуя с белками патогена. Ответы клетки на патогены вирусного и невирусного происхождения имеют схожие реакционные модули, и в настоящее время противовирусные иммунные ответы включены в зигзагообразную модель врожденного иммунитета (Jones and Dangl, 2006; Mandadi and Scholthof, 2013). Помимо иммунных ответов значительную роль в противовирусной защите играет РНКи. Описано множество вирусных белков, подавляющих данный механизм защиты (Csorba et al., 2015). Вирусные супрессоры сайленсинга связываются с различными компонентами системы РНКи, такими как белки и двуцепочечная РНК (дцРНК), имеющими решающее значение для запуска и работы механизма РНКи. Исследования показывают, что дцРНК может индуцировать реакции врожденного иммунитета, в частности РТИ (Pathogen-associated molecular pattern-Triggered Immunity) (Kørner et al., 2013; Niehl et al., 2016). Врожденный иммунитет и РНКи являются основными защитными механизмами против вирусной инфекции и, как правило, действуют на начальных этапах инфекции (Mandadi and Scholthof, 2013; Moon and Park, 2016; Calil and Fontes, 2017; Gouveia et al., 2017; Wu et al., 2019). В недавнем исследовании была предложена модель, в рамках которой тобамовирусные транспортные и репликазные белки действуют как вирусные эффекторы, подавляя РТИ и РНКи, соответственно (Huang et al., 2023). Репликазные белки мультиплицируют вирусную РНК и выступают в качестве фактора вирулентности в центре очага инфекции. Транспортные белки обеспечивают транспортировку вирусного генома из клетки в клетку и выступают в качестве фактора вирулентности на лидирующем фронте инфекции, подавляя РТИ (Huang et al., 2023). Такая мультифункциональность вирусных белков предполагает множественные взаимодействия с десятками клеточных факторов, роль которых в описанных выше иммунных ответах не определена, либо они являются участниками иных ответов в системе взаимодействий вирус-растение.

Множество исследований описывает эти клеточные факторы как белки с провирусной или антивирусной активностью (Garcia-Ruiz, 2018; Garcia-Ruiz, 2019). Но актуальным остается вопрос, какова в действительности динамичная картина этих взаимодействий на всех этапах вирусного патогенеза, начиная с первичной инфицированной клетки до развития системной инфекции.

Подавление защитных механизмов клетки и активная вирусная репродукция, как правило, сопряжены с изменением активности межклеточного транспорта, посредством которого происходит и коммуникация между клетками, и ближний транспорт вирусов. Плазмодесмы (ПД) – это каналы между клетками, которые обеспечивают межклеточный транспорт метаболитов и сигнальных молекул и, следовательно, играют решающую роль в развитии и физиологии растений, а также в реакциях на сигналы окружающей среды и стрессы. Появляются доказательства, что плазмодесмы контролируются сигналами, исходящими от других органелл, в первую очередь от хлоропластов и митохондрий. Эти сигналы действуют в ядре, изменяя экспрессию генов, которые контролируют как транспорт через плазмодесмы, так и биогенез последних. Взаимосвязь между функционированием хлоропластов и регуляцией функции ПД лежит в основе гипотезы о путях сигнализации между органеллами, ядром и регуляцией функции плазмодесм (ONPS, organelle-nucleus-PD signaling). Данная гипотеза описывает ключевое значение хлоропластов и митохондрий в обеспечении всех жизненных процессов, регуляции метаболизма клетки, синтезе и транспорте фотоассимилятов, а также реакциях на стрессовые воздействия (Burch-Smith et al., 2011; Azim and Burch-Smith, 2020).

Геномы вирусов растений кодируют белки, способные внедряться в различные эндомембранные компартменты клетки, в том числе ядро, где они оказывают влияние на экспрессию генов, и хлоропласты (Qiao et al., 2009; Levy et al., 2013; Levy, 2015; Bhattacharyya and Chakraborty, 2018). Многие хлоропластные белки участвуют в противовирусных ответах (Abbink et al., 2002; Caplan et al., 2008; Bhat et al., 2013), а симптоматика вирусного патогенеза зачастую сопряжена с хлорозом, изменением пигментации или мозаичностью инфицированных листьев, что возникает из-за дисфункции хлоропластов, вызванной истощением энергоресурсов и накоплением вирусных факторов в клетке (Reinero and Beachy, 1989; Qiao et al., 2009; Bhat et al., 2013; Li et al., 2016; Bhattacharyya and Chakraborty, 2018; Budziszewska and Obrępalska-Stepłowska, 2018). В систему взаимодействий вирус-растение вовлечено множество клеточных факторов. Одним из таких факторов является ген, кодирующий гомолог ингибитора пептидаз Кунитца (*KPILP*, *Kunitz peptidase inhibitor-like protein*). Ген *KPILP*

обнаружен у представителей семейства Пасленовые, в том числе в табаке, картофеле, томате и других, и кодирует белок, который имеет все структурные элементы, присущие ингибиторам пептидаз Кунитца (KPI), но в отличие от KPI *Arabidosis thaliana*, KPILP не ингибирует сериновые пептидазы (Li et al., 2008a; Sheshukova et al., 2017). Было показано, что уровень мРНК *KPILP N. benthamiana* в корнях существенно выше, чем в фотосинтетически активных зрелых листьях. Кроме того, в инфицированном вирусом табачной мозаики (ВТМ) листе табака с проявлением симптомов в виде мозаики в светло-зеленых зонах с измененной пигментацией и активной репродукцией вируса уровень мРНК *KPILP* существенно выше, чем в темно-зеленых зонах (Sheshukova et al., 2017). Данное наблюдение указывает на существование обратной взаимосвязи между фотосинтезом и экспрессией *KPILP*: во-первых, экспрессия *KPILP* активна в корнях, где не происходит фотосинтез; во-вторых, при инфекции ВТМ происходят структурные и функциональные изменения хлоропластов наряду с активацией экспрессии *KPILP*. Нарушение работы хлоропластов приводит к запуску передачи регуляторных сигналов от пластид в ядро, что, в свою очередь, влияет на защитные реакции клетки и экспрессию ядерных генов, ассоциированных с фотосинтезом, и отражается на репродукции вируса (Brunkard and Burch-Smith, 2018; Crawford et al., 2018). Но какую роль KPILP играет на фоне тобамовирусного патогенеза, способствует ли он развитию инфекции или, напротив, участвует в противовирусных защитных реакциях, оставалось неясным.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы было изучение свойств и функций гомолога ингибитора пептидаз Кунитца *Nicotiana benthamiana* (NbKPILP), и определение его роли в системе взаимодействий вирус-растение.

Для достижения цели были решены следующие задачи:

1. Анализ уровня экспрессии *NbKPILP* в условиях системной инфекции X вируса картофеля (ХВК) и тобамовирусов, ВТМ и ВТМ крестоцветных (крВТМ¹), в модельном растении *N. benthamiana*
2. Создание модельной системы для анализа функций *NbKPILP* во взаимодействии вирус-растение и исследование влияния *NbKPILP* на физиологический статус растения *N. benthamiana*
3. Выявление влияния *NbKPILP* на репродукцию и развитие системной инфекции тобамовирусов ВТМ и крВТМ

¹ Согласно современной номенклатуре крВТМ, изначально идентифицированный на кафедре вирусологии биологического факультета МГУ, считается изолятом вируса просветления жилок турнепса (Turnip vein-clearing virus, TVCV). В литературных источниках, тем не менее, используются оба названия, TVCV и crTMV (крВТМ). В контексте настоящей работы обозначение крВТМ относится к вышеуказанному изоляту и векторам на основе его генома.

Объект и предмет исследования. Объектами исследования были клеточный фактор KPILP *Nicotiana benthamiana* и вирусы растений (потексвирус и тобамовирусы). Предметом исследования было изучение влияния повышенной экспрессии *NbKPILP* на развитие вирусной инфекции.

Научная новизна работы. Полученные в настоящей работе результаты обладают научной новизной и имеют теоретическую и практическую значимость. Проведенное исследование выявило существование нового провирусного фактора, который принимает активную роль в развитии тобамовирусной инфекции в модельном растении *N. benthamiana*, которое относится к семейству Пасленовые. Данные, полученные в исследовании, могут быть экстраполированы на других представителей семейства.

Теоретическая и практическая значимость работы. Охарактеризованные свойства и функции нового клеточного фактора *NbKPILP*, принимающего участие в регуляции физиологических процессов в условиях вирусного патогенеза, расширяют представления о системе взаимодействий вирус-растение

Замедление вирусного патогенеза, вызванное подавлением экспрессии нового провирусного клеточного фактора *NbKPILP*, дает основу для разработки подходов, направленных на создание безвирусного сельского хозяйства.

Методология и методы диссертационного исследования. Экспериментальная работа проведена на модельном растении *N. benthamiana*, относящемся к семейству Пасленовые и экономически значимых тобамовирусах. Для создания генетических конструкций использованы стандартные генно-инженерные методы; заражение растений проводили частицами ВТМ через поранение абразивом поверхностных тканей листа; для инфицирования ХВК или крВТМ были использованы векторы, созданные на основе геномов этих вирусов; доставка генетического материала осуществлялась посредством агробактерии *Agrobacterium tumefaciens*; оценка накопления РНК осуществлена при помощи ПЦР в реальном времени, предваряемой обратной транскрипцией; работа с белками и РНК осуществлена согласно методам, описанным в литературе; оценка глюкозы в тканях выполнена посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии; оценка каллозы произведена с использованием конфокальной лазерной флуоресцентной микроскопии с предварительным окрашиванием флуоресцентным красителем; количественный анализ флуоресцентного сигнала проведен при использовании программного обеспечения ImageJ.

Положения, выносимые на защиту

1. Инфекция ХВК, ВТМ и крВТМ активирует экспрессию *NbKPILP* в листьях растения *Nicotiana benthamiana*.
2. *NbKPILP* участвует в регуляции физиологического статуса растения *N. benthamiana* на фоне вирусного патогенеза.
3. *NbKPILP* способствует репродукции, а также ближнему и системному транспорту тобамовирусов в *Nicotiana benthamiana*.
4. Подавление экспрессии *NbKPILP* приводит к замедлению развития симптоматики и снижению смертности растений при инфицировании тобамовирусами.

Степень достоверности и апробация результатов. В ходе работы использовались общепризнанные современные методы и подходы; достоверность полученных данных подтверждается достаточным количеством воспроизводимых результатов, их статистической обработкой и публикацией результатов в рецензируемых журналах. Апробация проведена на межлабораторном семинаре ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН 19 февраля 2025 г. Работа была представлена на 43-м конгрессе FEBS Open Bio (2018 г.), 44-м и 45-м конгрессе FEBS (2019 и 2021 г.); на VII Съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященному 100-летию кафедры генетики СПбГУ, Санкт-Петербург, (2019 г.); конференции «Биологическая защита растений — основа стабилизации агроэкосистем», Краснодар (2022 г.); II научном форуме «ГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ РОССИИ», С.-Петербург (2023 г.). По материалам диссертационной работы опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в Диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Личный вклад соискателя. Личный вклад заключался в анализе данных литературы, постановке задач и экспериментов, интерпретации результатов и построении гипотез на основе полученных данных, подготовке публикаций и текста диссертации.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, основной части, обсуждения результатов, заключения и списка цитируемой литературы из 377 наименований. Работа изложена на 118 страницах машинописного текста и включает 17 рисунков и 2 таблицы.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Развитие вирусной инфекции и внутриклеточные изменения

Вирусы растений, или фитовирусы – это облигатные внутриклеточные паразиты, геном которых весьма ограничен, поэтому они полностью зависят от клеток, в которые они попадают. Инфицирование растительной клетки может происходить посредством переносчиков (например, насекомых или травоядных), а также через механическое повреждение тканей или вертикальным переносом через семена (Gallet et al., 2018; Xu et al., 2023). Вирусы растений классифицируются по типу нуклеиновой кислоты, которой представлен их геном. Подавляющее большинство вирусов растений имеют геномы, представленные одноцепочечной смысловой (+)РНК, также существуют вирусы, геном которых имеет антисмысловую (-)РНК или двуцепочечную. Другие вирусы растений имеют геном, представленный ДНК, которая может быть двухцепочечной (Caulimoviridae) или одноцепочечной (Geminiviridae) (Baltimore, 1971). Несмотря на различия в организации и экспрессии генома, морфологии вирионов и круге хозяев, (+)РНК-вирусы имеют принципиально схожие стратегии репликации генома. Для большинства (+)РНК-содержащих вирусов синтез (-) цепи РНК сопряжен с трансляцией репликативных белков, а затем на матрице (-)РНК происходит синтез (+)РНК и субгеномных РНК (сРНК). РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp, RNA-dependent RNA polymerase) является основным белком, который катализирует репликацию и образование сРНК. Также в этом процессе задействованы факторы как вирусного, так и клеточного происхождения, которые в совокупности образуют репликативные комплексы (VRC, viral replication complex) (Laliberté and Sanfaçon, 2010; Hyodo and Okuno, 2016).

(+)РНК-вирусы являются наиболее распространенными вирусами растений и включают множество вирусов, экономически значимых для сельского хозяйства. Размножение вируса внутри растения зависит от клеточных механизмов хозяина, которые используются вирусом для репликации генома, перемещения от клетки к клетке через плазмодесмы, а также системного распространения через флоэму. Для осуществления всего жизненного цикла и производства инфекционного потомства вирусы используют различные клеточные факторы, что в конечном итоге приводит к истощению пораженных тканей, возникновению характерной симптоматики и даже гибели всего растения. Из-за ограниченного размера генома и его кодирующего потенциала (+)РНК-вирусы максимально эффективно используют компоненты клетки-хозяина для успешного заражения, «эксплуатируя» клеточные белки, мембраны и метаболиты (Miller and Krijnsen-Locker, 2008; Wang and Krishnaswamy, 2012; Kushwaha et al., 2015; Fernández de Castro et

al., 2016). Следовательно, репродукция вируса нарушает клеточный метаболизм и определяет развитие заболевания. Репродукция вируса также индуцирует защитные реакции растений, влияя на передачу сигналов фитогормонов, вызывает нарушения развития и морфологические аномалии, включая локальные и системные реакции, в т.ч. гибель клеток (Mandadi and Scholthof, 2013). Таким образом, вирусный патогенез - это результат сложных взаимодействий между вирусами и растениями, приводящий к возникновению множества тяжелых заболеваний и оказывающий мощное негативное воздействие на производительность аграрного сектора.

Стратегии защиты растения при вирусной инфекции

Растения развили очень сложную, четко регулируемую и многоуровневую иммунную систему для борьбы с вирусным патогенезом. Заражение и репликация вирусов в растении-хозяине вызывают так называемые доминантные защитные механизмы для борьбы с инфекцией, включая (i) врожденный иммунитет, (ii) РНК интерференцию, (iii) репрессию трансляции, (iv) деградацию белков, опосредованную убиквитинированием, (v) нонсенс-опосредованную деградацию вирусной РНК (Covey et al., 1997; Hamilton and Baulcombe, 1999; Liu et al., 2002; Soosaar et al., 2005; Mandadi and Scholthof, 2013; Garcia et al., 2014; Gouveia et al., 2017). Рецессивная устойчивость как специфический механизм противовирусной устойчивости состоит в потере ключевых факторов хозяина, необходимых для пролиферации вируса (Diaz-Pendon et al., 2004; Wang and Krishnaswamy, 2012).

Врожденный иммунитет растения

Растения реагируют на патогены, используя врожденную иммунную систему, которую в общих чертах разделяют на иммунитет, вызванный молекулярными паттернами патогена (PTI, pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity), и иммунитет, запускаемый эффекторными молекулами (ETI, effector-triggered immunity). PTI активируется, когда специальные рецепторы распознавания на поверхности мембраны клетки (PRR, pattern recognition receptor) встречают определенные молекулярные структуры патогенов (PAMP/MAMP, pathogen- или microbe-associated molecular pattern) или эндогенные сигналы, выделяемые растением при повреждении или воздействии патогена, которые называются молекулярными паттернами повреждения (DAMP, damage-associated molecular patterns) (Macho and Zipfel, 2014). Чтобы преодолеть первую линию защиты, патогены выделяют в растительные клетки эффекторы, которые ингибируют PTI, приводя растительную клетку в состояние чувствительности к патогену (ETS, effector-

triggered susceptibility). Противодействуя этой стратегии вирулентности, растительные клетки синтезируют белки внутриклеточной устойчивости (R), которые специфически распознают эффекторы патогена, или факторы авирулентности (Avr), и активируют ETI. Эти совместно развивающиеся стратегии вирулентности патогенов и механизмы устойчивости растений иллюстрируют эволюционную гонку вооружений между патогеном и хозяином, которая интегрирована в зигзагообразную модель врожденного иммунитета растений и определяется формулой [PTI-ETS+ETI]. Кульминацией ETI и в ряде случаев PTI может стать реакция гиперчувствительного ответа (HR, hypersensitive response) и полная устойчивость к патогену (Jones and Dangl, 2006).

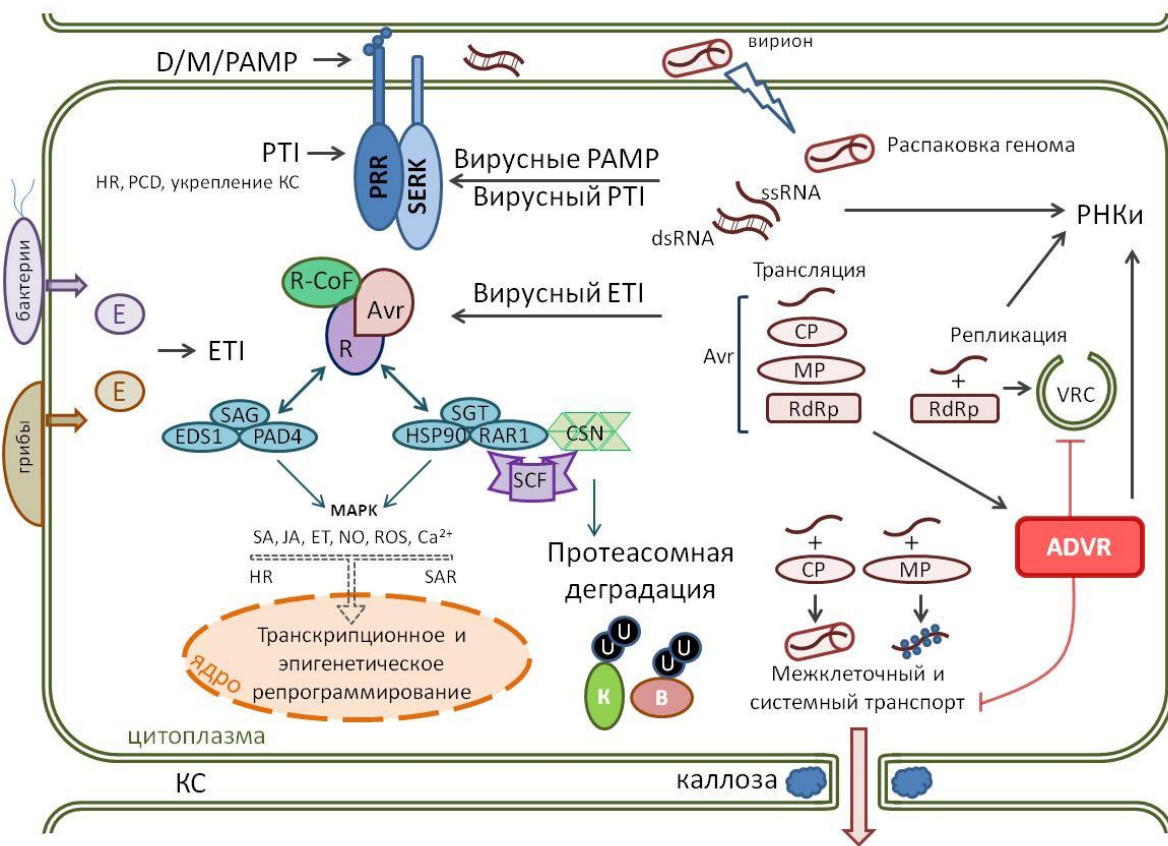


Рисунок 1. Схематическое изображение запуска защитных реакций растительной клетки при атаке вирусных и невирусных патогенов. Пояснения в тексте. D/M/PAMP, damage-, microbe-pathogen-associated molecular pattern; PTI, pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity; ETI, effector-triggered immunity; ADVR, atypical dominant viral resistance; E, эффекторные белки, секретируемые бактериями и грибами; HSP90/RAR1/SGT1 и EDS1/PAD4/SAG101 – белковые модули, состоящие из SGT1, RAR1 и HSP90 и EDS1, PAD4 и SAG101, соответственно; PHKi, PHK интерференция; R, белок резистентности; R-CoF, кофактор белка R; Avr, фактор авирулентности; PRR, Pattern Recognition Receptor; SERK, корецептор PRR; MAPK, mitogen-activated protein kinase; HR, гиперчувствительный ответ; SAR, приобретенная системная устойчивость; SA, салициловая кислота; JA, жасмоновая кислота; ET, этилен; NO, оксид азота; ROS,

активные формы кислорода; CSN, комплекс белков, участвующий в деградации белка по убиквитин-зависимому пути; SCF, компонент E3-убиквитин-лигазного комплекса; U, убиквитин; CP, белок оболочки вируса; MP, транспортный белок вируса; RdRp, белок репликазы вируса; VRC, вирусная «фабрика»; ssRNA, одноцепочечная РНК; dsRNA, двуцепочечная РНК; HR, гиперчувствительный ответ; PCD, запрограммированная клеточная смерть; K и B, белковые факторы клеточного и вирусного происхождения, соответственно; KS, клеточная стенка. Адаптировано из (Mandadi and Scholthof, 2013; Gouveia et al., 2017; Wu et al., 2019).

Исследования взаимодействий растений и вирусов положили начало описанию парадигм иммунного противовирусного ответа, которые включали HR и системную приобретенную устойчивость (SAR, systemic acquired resistance) (Holmes, 1929; Ross, 1961). Но до недавнего времени эти концепции противовирусного иммунитета были исключены из зигзагообразной модели врожденного иммунитета. В 2013 году концепция, описывающая иммунитет растений, была дополнена новыми терминами: вирусные эффекторы, вирусный PTI и вирусный ETI, которые интегрированы в современные модели иммунных реакций растения (рис. 1) (Mandadi and Scholthof, 2013).

Вирусный ETI

HR и некротические реакции придают устойчивость растениям к разнообразным патогенным грибам, бактериям и фитовирусам и происходят по довольно схожим механизмам. Типичные эффекторы бактерий и грибов доставляются в клетки через системы секреции, тогда как вирусные эффекторы, кодируемые вирусным геномом, синтезируются непосредственно в цитоплазме растительной клетки. Из-за ограничения кодирующей способности вирусных геномов практически все вирусные белки, такие как репликазы, транспортные белки (ТБ), белок оболочки (БО), могут действовать как детерминанты Avr (рис. 1). Во время вирусной инфекции, как и при невирусных инфекциях, реакция HR инициируется взаимодействием Avr-R, т.е. белков авирулентности и резистентности. Такое взаимодействие приводит к метаболическим изменениям уровней защитных гормонов, таких как салициловая кислота (СК) и жасмоновая кислота (ЖК), оксида азота (NO), накоплению активных форм кислорода (АФК) как в инфицированных, так и в неинфицированных тканях (Carr et al., 2010; Calil and Fontes, 2017; Gouveia et al., 2017). Поэтому вирусные факторы, которые мешают защите, также называются вирусными эффекторами, или факторами вирулентности (Vir), а иммунный ответ, который они вызывают, определяется как вирусный ETI. HR также связан с нарушением гомеостаза ионов Ca^{2+} , целостности мембран и активацией каспазоподобных протеаз, таких как вакуолярный процессинговый фермент (VPE,

vacuolar processing enzyme), который считается основным ферментом, запускающим гибель клеток во время HR (Mur et al., 2008). Реакция HR, приводящая к гибели клеток, часто связана с устойчивостью к патогену. Но устойчивость - это не всегда гибель клеток при HR. Например, белок Tm-1 придает растениям томата устойчивость к вирусу мозаики томата, относящемуся к тобамовирусам (ToMV, tomato mosaic virus), путем инактивации белка репликазы ToMV, не вызывая HR-ассоциированной гибели клеток (Ishibashi et al., 2007). В данном случае белок Tm-1 является клеточным фактором устойчивости R, а белок репликазы ToMV – вирусным фактором Avr.

Большинство противовирусных R генов кодируют NB-LRR белки с нуклеотид-связывающими свойствами (nucleotide-binding и leucine-rich repeat белковые семейства), которые опосредуют устойчивость при специфическом (прямом или непрямом) узнавании вирусного фактора Avr (Gouveia et al., 2017). NB-LRR белки содержат дополнительные высоко консервативные N-терминальные домены, такие как домен CC (coiled-coil) или домен TIR (Toll/interleukin 1 receptor-like) (Bonardi et al., 2012). Оба типа R факторов, CC-NB-LRR и TIR-NB-LRR, непосредственно распознают патогенный Avr фактор или такое взаимодействие опосредуется другими белками-кофакторами (R-CoF) (Collier and Moffett, 2009).

Сигнальный каскад, запускаемый R белками, включает в себя быструю активацию MAP-киназ (MAPK, mitogen-activated protein kinase) и изменения в экспрессии защитных генов и уровнях гормонов. Конвергенция между вирусным и невирусным ETI наблюдается в участии в этом процессе двух белковых функциональных модулей, контролирующих стабилизацию и дестабилизацию белка R (Kadota and Shirasu, 2012; Hoser et al., 2013). Первый модуль – это шапероновый комплекс, состоящий из SGT1 (SUPPRESSOR OF THE G2 ALLELE OF SKP1) (Austin et al., 2002), RAR1 (REQUIRED FOR MLA12 RESISTANCE1) (Bieri et al., 2004) и HSP90 (HEAT SHOCK PROTEIN90) (Takahashi et al., 2003). HSP90/RAR1/SGT1 способствует стабильности и правильному сворачиванию белков R во время активации (Liu et al., 2004; Dodds and Rathjen, 2010). Другой функциональный модуль включает EDS1 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1) (Aarts et al., 1998; Falk et al., 1999), PAD4 (PHYTOALEXIN DEFICIENT4) (Feys et al., 2001) и SAG101 (SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101) (Feys et al., 2005) и отвечает за индукцию HR. Оба модуля, HSP90/RAR1/SGT1 и EDS1/PAD4/SAG101, служат посредниками в реакциях устойчивости против различных вирусных и невирусных патогенов. Это позволяет предположить, что растения развили

широкий спектр устойчивости к болезням для одновременной защиты от различных типов патогенов.

Первым идентифицированным геном *R* является ген *N* табака *Nicotiana glutinosa*, который придает устойчивость практически ко всем тобамовирусам в растениях, содержащих ген *N* (Tóbiás et al., 1982; Pelletier and Moffett, 2022). Белок *N* обладает сигнатурами TIR-NB-LRR и индуцирует полную устойчивость к вирусу табачной мозаики, ВТМ (Whitham et al., 1994). ВТМ – это вирус растений, который имеет довольно широкий круг хозяев, в том числе представители семейства Пасленовые. Его геном представлен одноцепочечной (+)РНК, состоящей из ~6400 нт, который кодирует как минимум четыре белка: два белка репликативного комплекса, 126 кДа и 183 кДа, а также ТБ и БО (Goelet et al., 1982). Кроме того, геном ВТМ содержит открытую рамку считывания (ОРС) для предполагаемого белка массой 54 кДа, роль которого неопределена, и ОРС, кодирующую белок 4,8 кДа, который влияет на симптоматику при инфекции (Sulzinski et al., 1985; Canto et al., 2004; Gushchin et al., 2013; Palukaitis et al., 2024). Белок *N* является фактором *R*, он опосредованно взаимодействует с хеликазным доменом р50 репликазы ВТМ, вызывая устойчивость. Однако, полная устойчивость к ВТМ, зависит от белка NRIP1 (N RECEPTOR-INTERACTING PROTEIN1), взаимодействующего с белком *N*. NRIP1 - это кофактор (R-CoF), который рекрутируется из хлоропластов в цитоплазму и ядро при наличии в клетке эффектора р50 и напрямую взаимодействует с белком устойчивости *N* (Caplan et al., 2008). Функциональность *N* белка зависит от шаперонового комплекса HSP90/RAR1/SGT1 и олигомеризации белка на ранних стадиях развития инфекции. Взаимодействие шаперонного комплекса с белком *N* происходит в цитоплазме, и SGT1 контролирует его ядерно-цитоплазматическое распределение (Hoser et al., 2013). Появление в клетке хеликазного домена р50 репликазы ВТМ приводит к конформационным изменениям *N* белка и его олигомеризации, что, в свою очередь, является необходимым для индукции устойчивости к ВТМ и запуска HR (Mestre and Vaulcombe, 2006). Внутри ядра белок *N* взаимодействует с транскрипционными факторами, модулируя экспрессию генов, связанных с защитой. Примером такого транскрипционного фактора является SPL6 (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 6), который взаимодействует с белком *N* в присутствии р50 и активирует множество защитных генов (Padmanabhan et al., 2013). SPL6 также участвует в обеспечении устойчивости к бактериальному патогену *Pseudomonas syringae* у арабидопсиса (Padmanabhan et al., 2013). Таким образом, модуляция экспрессии защитных

генов, опосредованная SPL6, представляет собой еще одну точку конвергенции иммунных ответов на вирусные и невирусные патогены, индуцируемых Avr-R взаимодействиями.

Ген *N'* *Nicotiana sylvestris* кодирует иммунный рецептор типа CC-NB-LRR, который индуцирует HR и придает устойчивость к различным тобамовирусам, распознавая белок оболочки (Culver and Dawson, 1989; Saito et al., 1989). Ген *N'* обеспечивает устойчивость к ToMV, вирусу мягкой крапчатости перца (PMMoV) и вирусу коричневой морщинистости плодов томатов (ToBRFV) (Sekine et al., 2012; Pelletier and Moffett, 2022).

Tm-2 и *Tm-2²* – два аллеля одного гена, которые кодируют белки класса CC-NB-LRR (Lanfermeijer et al., 2005). Оба аллеля были обнаружены в дикорастущем томате *Solanum peruvianum* и введены в культивируемые сорта. *Tm-2* и *Tm-2²* придают устойчивость к тобамовирусам, включая ВТМ и ToMV, распознавая ТБ (Pelham, 1966; Weber and Pfitzner, 1998; Lanfermeijer et al., 2003). *Tm-2²* также придает устойчивость к вирусу крапчатой мозаики томата (ТоММВ), эта устойчивость проявляется при аллельных комбинациях: гомозиготности *Tm-2²Tm-2²* и гетерозиготности *Tm-2Tm-2²*, но не *tm-2Tm-2²*, а также зависит от температуры (Tettey et al., 2023). *Tm-2²* распознает N-терминальный домен ТБ и ассоциирован с ПМ, хотя сам белок не обладает трансмембранными доменами (Chen et al., 2017). В присутствии вирусного ТБ происходит активация *Tm-2²* за счет его самоассоциации (Wang et al., 2020). Стабильность *Tm-2²* зависит от SGT1 и Hsp90, которые служат посредниками в реакциях устойчивости (Liu et al., 2004; Dodds and Rathjen, 2010; Qian et al., 2018). Устойчивость, опосредованная *Tm-2²*, зависит от его уровня экспрессии: высокие уровни экспрессии индуцируют экстремальную устойчивость без какой-либо видимой симптоматики; средние уровни запускают полную устойчивость, сопровождаемую HR; при низких уровнях происходит частичная устойчивость, сопровождаемая системными некрозами по всему растению (Zhang et al., 2013).

Ген *Rx1* картофеля представляет еще один детально изученный пример R фактора, индуцирующий экстремальную устойчивость к X вирусу картофеля (ХВК). ХВК – распространенный вирус экономически значимых растений семейства Пасленовые, имеющий (+)РНК-геном (Huisman et al., 1988). В отличие от других иммунных реакций устойчивости, эта чрезвычайная устойчивость не связана с HR в месте инфицирования, а скорее связана с ранним прекращением накопления вируса в первично инфицированной клетке через клеточную гибель (Bendahmane et al., 1999). Белок Rx относится к R белкам с доменами CC-NB-LRR, его фактором Avr является БО ХВК, распознавание которого происходит при участии кофактора RanGAP2 (Ran GTPase-activating protein 2). RanGAP2

контролирует ядерно-цитоплазматическое распределение Rx и его олигомеризацию (Tameling et al., 2010; Nao et al., 2013). Считается, что RanGAP2 действует как цитоплазматический фактор удержания Rx. БО ХБК распознается в цитозоле, и передача сигналов также активируется в этом компартменте. Концентрация Rx в цитозоле посредством сверхэкспрессии RanGAP2 усиливает передачу сигналов устойчивости, тогда как концентрация Rx в ядре посредством взаимодействия с химерной версией RanGAP2, содержащей сигнал ядерной локализации, ингибирует передачу сигналов устойчивости (Slootweg et al., 2010; Tameling et al., 2010). Ядерно-цитоплазматическое распределение белка Rx также контролируется белковым модулем HSP90/RAR1/SGT1 (Slootweg et al., 2010; Hoser et al., 2014), а его наличие как в ядре так и в цитоплазме является необходимым условием для распознавания фактора Avr и запуска полноценного иммунного ответа на ХБК. Как при устойчивости, индуцированной Rx, так и при устойчивости, индуцированной N, белок R активируется в цитоплазме, однако полная его функциональность зависит от (i) его распределения между ядром и цитоплазмой, (ii) действия кофактора и (iii) шаперонового модуля. Таким образом, оба клеточных фактора, Rx и N, индуцируют запуск иммунного ответа по доминантному механизму защиты. Множество аналогичных примеров R факторов с доменами типа NB-LRR, действующие по доминантному механизму иммунной защиты описаны на данный момент. Эти примеры иллюстрируют консервативность данного защитного механизма (Mandadi and Scholthof, 2013; Calil and Fontes, 2017; Gouveia et al., 2017).

Охарактеризовано несколько генов устойчивости, действующих по доминантному механизму, которые кодируют белки класса, отличного от NB-LRR (Mandadi and Scholthof, 2013; Gouveia et al., 2017; Wu et al., 2019). Обнаружено, что эти белки функционируют как сенсоры вирусной инфекции, но не индуцируют типичные защитные реакции ETI, такие как HR или клеточная смерть. В соответствии с современными представлениями о структуре и функции этих белков, ряд работ описывают их в контексте иммунного ответа ETI (Gouveia et al., 2017), другие исследования представляют эти белки как индуцирующие PTI (Wu et al., 2019). Несколько лет назад класс этих клеточных факторов получил название «белки атипичной доминантной вирусной устойчивости» (ADV RP, Atypical Dominant Viral Resistance Protein) (Wu et al., 2019). Одним из примеров таких белков является вышеупомянутый ген томата *Tm-1*, который обеспечивает устойчивость к тобамовирусу ToMV. Tm-1 связывается с белками репликации ToMV и ингибирует размножение ToMV, как считается, не вызывая иммунного ответа: связывание Tm-1 с белками репликации ToMV ингибирует репликацию и сборку репликационного

комплекса вируса на мембранах (Ishibashi and Ishikawa, 2013, 2014). Другим примером R белков, не относящихся к NB-LRR, являются сенсорные белки *Ty-1* и *Ty-3* томата, которые придают устойчивость к вирусу желтой курчавости листьев томата (TYLCV). Гены *Ty-1* и *Ty-3* являются аллельными, а линии, экспрессирующие эти гены, проявляют устойчивость к геминивирусам. Механизм действия связан с индукцией противовирусной РНК интерференции и усиленным подавлением транскрипции, поскольку в таких растениях повышен уровень малых интерферирующих РНК (siRNA), а промотор гена белка оболочки V1 TYLCV гиперметилирован (Verlaan et al., 2013; Butterbach et al., 2014).

Помимо вышеупомянутых факторов устойчивости, в обеспечении резистентности к вирусам участвуют и другие белки растения. Лектиновые белки являются новыми и интересными белками, опосредующими иммунные ответы. У животных лектины активируют иммунные реакции против различных патогенов. Определенные лектиновые рецепторы, такие как лектины типа С, распознают грибковые PAMP (Willment and Brown, 2008). В растениях лектины связываются с молекулами моно- или олигосахаридов, отличая углеводы собственного происхождения от чужеродных. А идентификация стресс-индуцибельных растительных лектинов делает класс этих белков привлекательным для изучения их свойств в контексте взаимодействий растение-патоген и активации их экспрессии в ответ на атаку патогена (Van Damme et al., 2004). Например, лектины бобовых с высоким сродством связываются со специфическими гептаглюкозидами *Phytophthora sojae*, которые представляют собой специфический молекулярный паттерн, PAMP, и запускают защитные реакции (Mithöfer et al., 2000; Fliegmann et al., 2004). В арабидопсисе обнаружен лектин жакалинового типа RTM1 (RESTRICTED TEV MOVEMENT1), который обеспечивает устойчивость к вирусу гравировки табака (Тобассо etch virus, TEV), блокируя его системный транспорт. Avr детерминантой для RTM1 считается белок оболочки, хотя БО TEV не гликозилирован, и данное взаимодействие, по всей видимости, происходит при участии других клеточных факторов (Chisholm et al., 2000; Sofer et al., 2017). Другой лектин жакалинового типа, JAX1, придает устойчивость к потексвирусам ХВК, вирусу мозаики подорожника азиатского (*Plantago asiatica* mosaic virus, PLAMV), вирусу мозаики белого клевера (White clover mosaic virus, WCMV) и вирусу аспарагуса 3 (*Asparagus virus 3*, AV-3) (Yamaji et al., 2012). Хотя JAX1 и RTM1 являются близкородственными лектиновыми белками, они придают различные формы устойчивости: JAX1 функционирует на клеточном уровне, ингибируя репликацию в случае потексвирусов (Yamaji et al., 2012), а RTM1 ингибирует системное движение потивируса (Chisholm et al., 2000). Оба белка, JAX1 и RTM1, являются R белками, которые

относятся к новому пути иммунного ответа, опосредуемого лектинами, LMR (lectin-mediated resistance). В отличие от устойчивости, запускаемой R белками, обладающими доменами NB-LRR, LMR не вызывает HR и SAR, а также не изменяет уровни СК, передачу сигналов или другие типичные изменения экспрессии защитных генов, обычно наблюдаемые при реакциях иммунной резистентности (Yamaji et al., 2012). Вероятно, иммунный ответ по типу LMR происходит по пока еще не выявленному молекулярному механизму вирусного ETI.

В результате исследования протеома листьев *N. benthamiana*, инфицированных ВТМ, были идентифицированы несколько классов белков, которые участвуют в начальных стадиях противовирусных иммунных ответов (Caplan et al., 2009). Авторы показали накопление цитоплазматических шаперонов HSP90, SGT1 и HSP70, которые участвуют в запуске ETI и регулируют активность иммунных рецепторов R, включая N (Liu et al., 2004), как упоминалось выше. Большое количество белков, обнаруженных в исследовании, относится к белкам, вовлеченным в производство и модуляцию цитоплазматических и хлоропластных уровней активных форм кислорода (АФК). Действительно, производимые хлоропластами АФК играют критическую роль при запуске HR, индуцируемой ВТМ (Liu et al., 2007). Помимо вышеуказанных белков, исследование показало роль резидентных шаперонов эндоплазматического ретикулаума (ЭР) в N-опосредованном HR. Этот класс белков включил PDI (protein disulfide isomerases), ERp57, P5, CRT3 (calreticulin 3), GRP78 (glucose regulated protein 78) и BiP5 (luminal-binding protein 5) (Caplan et al., 2009). Шаперонные комплексы ЭР участвуют в образовании дисульфидных связей между цистеинами, что часто является лимитирующей стадией сворачивания белка, проходящего традиционный путь внутриклеточной секреции (Hatahet and Ruddock, 2007). Белки плазматической мембраны и секретируемые белки, а также белки, находящиеся в компартментах эндоцитарных и экзоцитарных путей, сворачиваются и олигомеризуются в ЭР. Таким образом, ЭР является в некотором роде «фабрикой» по «укладке» белков (Christis et al., 2008). Если белок не сворачивается должным образом, он удаляется с помощью механизма ЭР-ассоциированной деградации (ERAD, Endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation) (Anelli and Sitia, 2008). Быстрое накопление в инфицированных тканях шаперонов предполагает, что шапероны ЭР функционируют на ранних стадиях вирусного ETI. А нарушение функции белков, обеспечивающих секреторный путь, нарушает секрецию клеточных белков, в том числе и мембранных рецепторов, участвующих в патогенезе, что приводит к снижению локальной и системной резистентности (Wang et al., 2005; Caplan et al., 2009).

В совокупности гены устойчивости *R*, особенно те, которые кодируют белки-рецепторы с доменом типа NB-LRR, играют консервативную роль в растениях, обеспечивая защиту клеток от различных вирусных и невирусных патогенов и резистентность к болезням. Более того, общий механизм распознавания белков *R* и факторов *Avr* схож для вирусных и невирусных патогенов, при этом кофакторы *R-CoF* играют решающую роль в управлении и модуляции взаимодействия *Avr-R*, в конечном итоге, активируя *HR* и резистентность. Хотя преобладающие реакции противовирусной резистентности опосредуются доминантными генами *R*, другие клеточные белки, такие как кофакторы *R*, факторы инициации элонгации, хлоропластные белки, шапероны ЭР, кальретикулины и лектиновые белки, также влияют на устойчивость растения к различным вирусным инфекциям.

Вирусный PTI

Врожденные защитные реакции растений активируются при восприятии консервативных PAMP/MAMP, которые представляют собой консервативные мотивы, производимые патогенами, а также эндогенных молекул DAMP, выделяемых хозяином во время атаки патогена или повреждения (рис. 1) (Macho and Zipfel, 2014). Обнаружение различных PAMP/DAMP с помощью соответствующих PRR белков на плазматической мембране активирует сигнальные каскады, что приводит к транскрипционным и физиологическим изменениям в клетках-хозяевах, которые предотвращают инфицирование и устанавливают PTI (Jones and Dangl, 2006; Macho and Zipfel, 2014; Bartels and Boller, 2015). У растений белки PRR представлены рецептороподобными киназами RLK (receptor-like kinase) и рецептороподобными белками RLP (receptor-like protein), расположенными на поверхности клетки, при этом оба типа рецепторов требуют присутствия корецептора для формирования активного комплекса и инициации передачи сигналов (Zipfel, 2014; Machado et al., 2015; Boutrot and Zipfel, 2017). Наиболее охарактеризованными корецепторами PRR являются члены подсемейства LRR II суперсемейства RLK (подсемейство LRRII-RLK). В геноме арабидопсиса это семейство представлено тремя кластерами: SERK1-5 (SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASES), кластер LRR-RLK с неизвестной функции и кластер NIK1-3 (NUCLEAR-SHUTTLE PROTEIN-INTERACTING KINASES) (Zhang et al., 2006; Sakamoto et al., 2012). Киназа SERK3, которая также называется BAK1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1)-ASSOCIATED KINASE 1), является наиболее хорошо охарактеризованным членом подсемейства SERK. SERK3 функционирует как корецептор нескольких PRR, таких как FLS2 (FLAGELLIN SENSING 2), EFR (ELONGATION FACTOR-thermo unstable (EF-Tu)

receptor) и PEPR1 (PEP1 receptor 1), которые воспринимают специфические PAMP/DAMP и запускают или усиливают бактериальный/грибковый РТИ (Chinchilla et al., 2007; Heese et al., 2007; Roux et al., 2011; Wang et al., 2014b). При восприятии PAMP FLS2 и EFR образуют лиганд-индуцированный комплекс с SERK3/BAK1, что приводит к быстрому фосфорилированию обоих белков и активации иммунных ответов, таких как активация митоген-активируемого протеинкиназного каскада (МАРК), транскрипционное репрограммирование защитных генов, связанных с патогенезом (PR, pathogenesis-related genes), продукции АФК, синтезу и отложению каллозы в плазмодесмах (ПД) и укреплению клеточной стенки (Kadota et al., 2014; Li et al., 2014; Macho and Zipfel, 2014; Couto and Zipfel, 2016; Tang et al., 2017). В ряде случаев активация РТИ приводит к гиперчувствительной реакции и запрограммированной клеточной гибели, возникающей в клетках в месте инфекции и вызывает дискретные некротические пятна (Coll et al., 2011). В настоящее время идентифицировано и охарактеризовано большое количество PRR растений и соответствующих им PAMP (Boutrot and Zipfel, 2017; Tang et al., 2017).

Несмотря на массу знаний о РТИ растений против невирусных патогенов, мало что известно о РТИ против фитовирусов, поскольку исторически они рассматривались как патогены, не кодирующие PAMP (Mandadi and Scholthof, 2013). Тем не менее, имеются данные, что РТИ также играет весомую роль во взаимодействиях растений и вирусов. Например, мутанты арабидопсиса по корецепторным киназам SERK3/BAK1 и/или SERK4 (также называемая BAK1-LIKE, BKK1) проявляют повышенную восприимчивость к различным РНК-вирусам (Yang et al., 2010; Kørner et al., 2013). Аналогично, нокадаун экспрессии гена перца, кодирующего трансмембранную рецепторную киназу *CaLecRK-S.5* с лектиновым доменом L-типа на N-конце белка, приводит к повышенной восприимчивости перца к нескольким невирусным и вирусным патогенам, включая тобамовирусы ВТМ и РММoV. Более того, предварительная обработка β -аминомасляной кислотой, химическим индуктором иммунитета (Wu et al., 2010), восстанавливает устойчивость к болезням у растений с сайленсингом *CaLecRK-S.5* (Woo et al., 2016). Еще одно доказательство существования вирусного РТИ у растений продемонстрировано при экзогенном применении двухцепочечной РНК (дцРНК), которая представляет собой хорошо изученный PAMP в противовирусном иммунитете животных (Alexopoulou et al., 2001; Yoneyama et al., 2004). Обработка растений дцРНК, очищенной из инфицированных вирусом растений или синтезированной *in vitro*, запускает типичные реакции РТИ у арабидопсиса, которые зависят от мембранного корецептора SERK1, но иммунный ответ происходит независимо от клеточного защитного механизма РНК интерференции (Niehl et

al., 2016). В совокупности, считается, что, вероятно, любая дцРНК, синтезированная *in vitro* или вирусного происхождения, индуцирует реакцию ответа РТІ (Kørner et al., 2013; Niehl et al., 2016; Huang et al., 2023). Недавно был продемонстрирован механизм преодоления противовирусного РТІ. Во-первых, поли(І:С) и вирусная дцРНК индуцируют РТІ и активируют отложения каллозы вокруг плазмодесм, что приводит к ограничению межклеточного транспорта вируса во время инфекции. Во-вторых, ТБ тобамовирусов ВТМ, вируса мозаики рапса (Oilseed rape mosaic virus, ORMV) и вируса просветления жилок турнепса (Turnip vein-clearing virus, TVCV) взаимодействуют с компонентами сигнальных путей, индуцируемых дцРНК, с целью инактивации РТІ и предотвращения «закрытия» плазмодесм на переднем фронте очага инфекции, что, в конечном итоге, приводит к «открытию» плазмодесм и распространению инфекции по ткани (Huang et al., 2023).

Также показано, что БО ВТМ и ХВК могут вызывать РТІ-подобные реакции у табака и арабидопсиса, соответственно (Allan et al., 2001; Perraki et al., 2018). Белок оболочки вируса является внешним компонентом всех вирусов, способным контактировать с поверхностью растительной клетки во время инвазии. Таким образом, возможно, что вирусный РТІ запускается неизвестными элементами, происходящими из БО вирусов, или трехмерной структурой вириона, которые распознаются как вирусные РAMP. Другой пример стратегии противодействия вирусному РТІ реализуется вирусом оспы сливы (Plum pox virus, PPV): БО этого потивируса подавляет иммунные реакции, такие как окислительный взрыв и продукцию АФК, и экспрессию маркерных генов РТІ при заражении арабидопсиса (Nicaise and Candresse, 2016). Авторы объясняют это тем, что БО PPV ведет себя как фактор вирулентности и, таким образом, противодействует функциям факторов, запускающих иммунные ответы. В совокупности развитие стратегий инфицирования и защиты – это весьма динамичные процессы с точки зрения эволюции как для невирусных патогенов, так и для фитовирусов. Существуют убедительные доказательства того, что последние также вписываются в зигзагообразную модель совместного развития стратегий врожденного иммунитета растений и патогенности инфекционных агентов (Jones and Dangl, 2006). Тем не менее, вирусные РAMP, растительные PRR, которые их воспринимают, и компоненты клеточной сигнализации в настоящее время все еще едва уловимы.

Протеасомная деградация

Убиквитин-зависимая протеасомная система (UPS, ubiquitin proteasome system) играет центральную роль в широком спектре фундаментальных процессов растений, включая деградацию и функциональную модификацию клеточных белков, а также передачу сигналов в ответ на абиотические и биотические стимулы (Sadanandom et al., 2012; Luo, 2016). Убиквитинирование – это многостадийная ферментативная реакция присоединения убиквитина (Ub) к белкам-мишеням. Данная реакция начинается с протеолиза предшественника Ub ферментами E1, активирующими Ub, в результате которой образуется промежуточный продукт E1-Ub. Затем активированный Ub переносится на Ub-конъюгирующие ферменты E2. После чего Ub переносится с промежуточного комплекса Ub-E2 на белки-мишени с помощью лигаз E3. E3-убиквитин-лигазные комплексы специфически убиквитинируют клеточные белки и направляют их на деградацию в протеасому (Hua and Vierstra, 2011). Механизм UPS имеет решающее значение для гомеостаза клеточных белков и участвует почти во всех клеточных процессах, а также принимает участие во взаимодействии вирус-хозяин почти на каждом этапе противовирусной защиты, как у растений, так и у животных (Gao and Luo, 2006; Citovsky et al., 2009). В свою очередь, вирусы развили множество стратегий, чтобы воздействовать на процессы UPS (Luo, 2016). Таким образом, механизм протеасомной деградации во взаимодействиях вирус-растение используется как защитный против инфекции, так и обеспечивающий вирулентность патогена.

Яркий пример участия механизма протеасомной деградации в противовирусной защите проиллюстрирован в работах на табаках с *N*-опосредованной устойчивостью к ВТМ. Белок SGT1, который является частью вышеупомянутого шаперонного комплекса HSP90/RAR1/SGT1, модулирующего функцию *N* гена, ассоциирован с компонентами E3-убиквитин-лигазы (Liu et al., 2002; Hoser et al., 2013). SGT1 физически взаимодействует с RAR1 и SKP1 (S-PHASE-KINASE-ASSOCIATED PROTEIN1), компонентом E3-убиквитин-лигазного комплекса типа SCF (SKP/Cullin/F-box) (Kitagawa et al., 1999; Hua and Vierstra, 2011). Белки RAR1 и SKP1 взаимодействуют с компонентами сигнасомы COP9 (CSN), которая представляет собой высококонсервативный эукариотический мультисубъединичный комплекс из 8 субъединиц, участвующий в деградации белка по убиквитин-зависимому пути в разнообразных клеточных процессах, включая регуляцию клеточного цикла, экспрессию генов, эмбриогенез, циркадные ритмы, реакцию растений на свет и гормоны, а также репарацию ДНК (Wei and Deng, 1999; Nezames and Deng, 2012). Нокадаун генов *RAR1*, *SGT1*, *SKP1* или компонентов сигнасомы приводит к утрате

N-опосредованной устойчивости к ВТМ у табаков (Liu et al., 2002). В совокупности эти взаимодействия указывают на важность убиквитин-опосредованного протеолиза и участие механизма UPS в *N*-опосредованных защитных реакциях HR.

Роль UPS во взаимодействии растения и вируса описана для ТБ ВТМ и вируса желтой мозаики турнепса (TYMV, Turnip yellow mosaic virus), которые подвергаются протеасомной деградации, что приводит к снижению патогенности (Reichel and Beachy, 2000; Drugeon and Jupin, 2002; Jakubiec et al., 2007), подчеркивая важное значение UPS для реализации противовирусных иммунных ответов. Однако, нельзя исключить, что деградация вирусных белков в процессе развития инфекции является нормальным физиологическим процессом обновления и регуляции количества вирусных факторов (Alcaide-Loridan and Jupin, 2012). ТБ тобамовирусов образует комплекс с вирусным геномом, обеспечивая его транспортировку к межклеточным каналам, плазмодесмам, и дальнейшее распространение инфекции в смежные клетки. Для межклеточного распространения достаточно небольших количеств ТБ, обеспечиваемых их временной экспрессией на переднем фронте фокуса инфекции (Maule Ph.D. and Palukaitis, 1991; Sheshukova et al., 2020). Доказательством такого свойства является исследование способности ТБ ВТМ стимулировать открытие плазмодесм только на переднем крае очага инфекции, но на более поздних стадиях инфекции в очаге это свойство не проявлялось, хотя ТБ все еще присутствовал в плазмодесмах (Oparka et al., 1997). Во время инфекции ТБ ВТМ локализуется также и в ассоциации с ЭР, актином и микротрубочками (Peña and Heinlein, 2012; Peiró et al., 2014). На более поздних этапах инфекции шаперон ЭР CDC48 (CELL-DIVISION-CYCLE protein 48) взаимодействует с ТБ и, как считается, «извлекает» его в цитоплазму для последующей деградации (Niehl et al., 2012). Тот факт, что ТБ ВТМ подвергается протеасомной деградации, вполне может являться следствием поддержания определенного гомеостаза вирусных белков при участии механизма UPS, приводящего к более эффективному развитию инфекции.

ТБ ВТМ был первым вирусным ТБ, о котором сообщалось, что он разрушается *in vivo* в протеасоме, поскольку ингибиторы протеасом приводят к повышению стабильности этого белка, который затем накапливается в полиубиквитинированной форме, предположительно в ЭР (Reichel and Beachy, 2000). Протеасомная деградация также была продемонстрирована для ТБ вируса скручивания листьев картофеля (PLRV, Potato leafroll virus) и TGBp3 ХБК (Vogel et al., 2007; Ju et al., 2008). Для TGBp3 показано, что транслокация этого белка из ЭР в цитоплазму для последующей деградации ассоциирована с механизмом ERAD, компонентом системы контроля качества белков,

который удаляет аберрантные белки из ЭР (Smith et al., 2011; Ye et al., 2011). Но данная деградация, как полагают авторы исследования, не является ограничивающим фактором вирусной инфекции (Ju et al., 2008). ERAD, по всей видимости, является прежде всего следствием стресса ЭР, предотвращающего цитотоксичность и гибель клеток. TGBp3 активирует экспрессию транскрипционного фактора bZIP60, участвующего в пути UPR (Unfolded protein response), и SKP1, компонента E3-убиквитин-лигазного комплекса типа SCF. UPR, вероятно, регулирует клеточную цитотоксичность, которая в противном случае могла бы привести к гибели клеток, если содержание TGBp3 ХБК в ЭР достигнет высоких уровней. SKP1, предположительно, используется вирусом для стимуляции протеасомной деградации AGO1 и подавления РНК интерференции (CHIU et al., 2010; Ye et al., 2011).

Процессы UPS используются многими вирусами для повышения вирулентности. Например, белок репликации вируса кустистой карликовости томатов (Tomato bushy stunt virus, TBSV), р33, взаимодействует с убиквитин-конъюгазой E2, Cdc34, а оптимальный уровень полиубиквитинирования р33, по-видимому, необходим для взаимодействия между компонентами репликазы TBSV и клеточными факторами, что в конечном итоге имеет решающее значение для эффективной репликации вируса (Li et al., 2008b). Подавление экспрессии гена, кодирующего субъединицу 26S протеасомы, *RPN9 N. benthamiana* ингибирует системный транспорт тобамовируса ВТМ и потивируса TuMV, двух таксономически различных вирусов. У растений с сайленсингом *RPN9* наблюдалось образование дополнительных жилок листа с увеличением доли ксилемы и сокращением флоэмы. Поскольку для системного транспорта вирусы используют сосудистую систему, преимущественно флоэму, то в растениях с нокдауном *RPN9* распространение вируса по растению было существенно замедленно (Crawford and Zambryski, 1999; Scholthof, 2005; Jin et al., 2006).

Процессы убиквитинирования обратимы под действием клеточных ферментов деубиквитиназ, DUB (deubiquitinase) (Komander et al., 2009). Активность DUB была обнаружена у белка репликационного комплекса 98К вируса TYMV (Chenon et al., 2012). Белки репликации TYMV синтезируются с геномной РНК в виде полипротеина длиной 206 аминокислот, который затем расщепляется на три белка 66К, 98К и 42К (Jakubiec et al., 2007). Субъединица 66К подвергается убиквитинированию с последующей UPS-опосредованной деградацией, в то время как субъединица 98К, благодаря своей активности DUB, обеспечивает деубиквитинирование 66К, стабилизируя его в клетке. Такой механизм, как полагают авторы, используется вирусом для поддержания стехиометрического соотношения 1:20 двух субъединиц, 66К и 98К, и способствует

вирусной инфекционности (Camborde et al., 2010; Chenon et al., 2012). Существует множество примеров эксплуатации вирусами механизмов протеасомной деградации, которые описаны в различных исследованиях и подтверждают вывод о том, что UPS может способствовать вирулентности (Alcaide-Loridan and Jupin, 2012; Mandadi and Scholthof, 2013; Calil and Fontes, 2017).

Рецессивная устойчивость

Растения реагируют на инфекцию с помощью различных доминантных защитных механизмов, часть из которых обсуждалась выше. Доминантная устойчивость зависит от способности растения распознавать возбудитель и быстро осуществлять комплекс защитных мер, часто связанных с развитием гиперчувствительной реакции. Невосприимчивость растения к вирусу также может быть результатом отсутствия специфических клеточных факторов, необходимых вирусу для репродукции, то есть устойчивость на видовом уровне. Возникновение мутаций в факторах, определяющих чувствительность растения к вирусу, также может приводить к устойчивости (Fraser, 1990). Развитие вирусной инфекции генетически детерминировано наличием у хозяина факторов, необходимых для репликации и перемещения вируса, а также балансом между защитными реакциями растения и подавлением вирусом этих реакций. Поскольку репертуар вирусных генных продуктов обычно очень мал из-за ограниченного размера генома, вирусам необходимо задействовать растительные факторы для завершения этапов инфекционного цикла. Взаимодействие компонентов растительной клетки и вируса приводит к восприимчивости растения, а мутации, приводящие к невозможности такого взаимодействия, придают устойчивость. Рецессивная устойчивость обусловлена мутациями в генах, которые кодируют факторы хозяина, критически необходимые для развития вирусной инфекции. Такие факторы, как правило, обуславливают восприимчивость растения к вирусу, и называются провирусными факторами. Растительные факторы с провирусной активностью были идентифицированы для всех этапов цикла вирусной инфекции: трансляции вирусной РНК, образования вирусных репликационных комплексов, накопления или активности белков репликации вируса, транспорта вируса и сборки вириона (Garcia-Ruiz, 2018).

Эукариотические факторы инициации трансляции (eIF) 4E и eIF4G и их изоформы являются наиболее изученными растительными факторами рецессивной устойчивости у нескольких видов сельскохозяйственных культур в отношении множества различных вирусов (Wang and Krishnaswamy, 2012). Аминокислотные замены в eIF4E обеспечивают

устойчивость к потивирусам и некоторым другим вирусам у арабидопсиса, томата, перца, гороха, дыни и ячменя (Lellis et al., 2002; Ruffel et al., 2002; Nicaise et al., 2003; Gao et al., 2004; Kanyuka et al., 2005; Piron et al., 2010). Мутации в другой субъединице фактора eIF4G придают рецессивную устойчивость против различных вирусов у риса и арабидопсиса (Yoshii et al., 2004; Albar et al., 2006). Мутации в факторах инициации трансляции снижают эффективность трансляции вирусных белков в клетках, что негативно влияет на репликацию вируса и его ближний транспорт.

Другой яркий пример рецессивной устойчивости опосредуется белками ТОМ (tobamovirus multiplication), которые определяют чувствительность к тобамовирусным инфекциям. ТОМ1 был идентифицирован в мутантных линиях арабидопсиса с потерей восприимчивости к тобамовирусу YoMV (Youcai Mosaic Virus) (Yamanaka et al., 2000). Однако мутация в *tom1* приводила лишь к частичной устойчивости, а у двойного мутанта *tom1tom3* проявлялась полная устойчивость к YoMV. При этом двойной мутант *tom1tom3* оставался чувствительным к двум другим вирусам, вирусу огуречной мозаики (Cucumber Mosaic Virus, CMV) и вирусу морщинистости турнепса (Turnip Crinkle Virus, TCV) (Yamanaka et al., 2002). Белки ТОМ1 и ТОМ3 являются интегральными мембранными белками, а функция ТОМ1, как полагают авторы, сводится к взаимодействию с репликационными белками вируса через хеликазный домен, при этом ТОМ1 является трансмембранным якорем для сборки вирусной «фабрики». Гомологи ТОМ1 и ТОМ3 кодируются в растениях рода *Nicotiana*, в томате, перце и рисе (Kumar et al., 2012). Подавление экспрессии *TOM1* и *TOM3* в *Nicotiana tabacum* через индукцию РНК интерференции привело к устойчивости табака к нескольким тобамовирусам, включая ВТМ, ТоMV, РММoV и вирус мягкой зеленой мозаики табака (Tobacco Mild Green Mosaic Virus, TMGMV). Белки ТОМ2А и ТОМ2В также участвуют в репликации тобамовирусов у арабидопсиса. ТОМ2А – это трансмембранный белок, который взаимодействует с ТОМ1 и является необходимым компонентом для сборки VRC (Tsujimoto et al., 2003).

Небольшой ГТФ-связывающий белок семейства ARF (ADP ribosylation factor), ARL8, был очищен из мембранной фракции клеток *Nicotiana tabacum*, инфицированных ТоMV (Nishikiori et al., 2011). ARL8 вместе с ТОМ1 участвует в репликации ТоMV путем регуляции ферментативной активности репликазы ТоMV при синтезе и кэпировании вирусной РНК. Хотя делеция любого из трех генов *ARL8* не приводила к изменению уровня накопления ТоMV у арабидопсиса, мутация генов *ARL8a* и *ARL8b* вызывала полное подавление вируса без какого-либо отрицательного воздействия на рост растений (Nishikiori et al., 2011). Белки ARL8 и ТОМ представляют собой примеры того, что гены

провирусных факторов и их функционально избыточные гомологи могут быть хорошими мишенями для мутагенеза или разработки препаратов, индуцирующих подавление их экспрессии через механизм РНКи, и придания рецессивной устойчивости к вирусам.

РНК интерференция

РНК интерференция (РНКи), или сайленсинг РНК, представляет собой консервативный механизм регуляции экспрессии генов, который реализуется во многих эукариотических организмах от растений до млекопитающих. РНКи является предметом пристального научного интереса последние три десятка лет, начиная с исследований механизма подавления активности гена халконсинтазы после введения его дополнительной копии в геном петунии и регуляции экспрессии генов нематоды при обработке дцРНК (N Napoli et al., 1990; Fire et al., 1998). РНКи запускается дцРНК, которые направляют специальный комплекс белков на посттранскрипционную деградацию целевых комплементарных транскриптов мРНК или подавление трансляции мРНК (явление, именуемое PTGS, post-transcriptional gene silencing) или на ингибирование транскрипции (TGS, transcriptional gene silencing) (Vaucheret et al., 2001; Castel and Martienssen, 2013). Механизмы РНКи играют ключевую роль в разнообразных клеточных, онтогенетических и физиологических процессах, регулируя экспрессию генов посредством малых некодирующих РНК (sRNA, small RNA), и связаны с контролем эпигенетических модификаций, регуляцией стабильности генома, образования гетерохроматина и движения транспозонов, а также с защитой от вирусных инфекций (Castel and Martienssen, 2013; Wang and Chekanova, 2016). Растительные sRNA очень разнообразны и включают в себя несколько подклассов в зависимости от их происхождения и биогенеза (Wang and Chekanova, 2016).

Механизмы РНКи у растений начинаются с процессинга предшественника дцРНК на короткие дуплексы микроРНК (miRNA) или малые интерферирующие РНК различного биогенеза (siRNA) (Baulcombe, 2004). miRNA кодируются генами *MIR*, которые транскрибируются РНК-полимеразой II с образованием предшественников miRNA, формирующих шпилечную структуру с двуцепочечными участками. siRNA могут происходить от дцРНК, образующихся вследствие действия вирусной RdRp как промежуточный продукт репликации РНК-вирусов, инфицирующих растения (Wang and Chekanova, 2016). Белки Dicer (эндорибонуклеазы, содержащие домен РНКазы III), которые у растений называются Dicer-like (DCL), процессируют дцРНК на короткие siRNA длиной 21-24 нт. DCL работают в ассоциации с белками DRB (DOUBLE-

STRANDED RNA BINDING) для точного процессинга siRNA (Hiraguri et al., 2005; Eamens et al., 2012). siRNA подвергаются модификации 2'-О-метилования на 3'-концевой рибозе с помощью метилтрансферазы HEN1 (HUA ENHANCER1) для повышения их стабильности (Li et al., 2005; Yu et al., 2005). Затем siRNA включаются в белковый комплекс, индуцирующий сайленсинг РНК, RISC (RNA-induced silencing complex), содержащий белок Argonaute (AGO), который обладает siRNA-связывающим доменом и эндонуклеолитической активностью по отношению к РНК-мишени. Активированный RISC впоследствии «расплетает» двуцепочечную siRNA, тем самым генерируя смысловую и антисмысловую (направляющую) цепи в АТФ-зависимой реакции. RISC, содержащий направляющую цепь, нацеливается на комплементарный транскрипт мРНК и расщепляет мРНК. В результате отсутствия мРНК не синтезируется и кодируемый белок (Baulcombe, 2004; Wang and Chekanova, 2016; Gaffar and Koch, 2019), что является одним из способов регуляции экспрессии на посттранскрипционном уровне.

РНКи является одним из основных механизмов противовирусной защиты у растений и состоит из фазы инициации, амплификации и системного распространения. Противовирусный сайленсинг инициируется дцРНК, которые могут образовываться из высокоструктурированных областей РНК-вирусов, репликативных интермедиатов РНК-вирусов или перекрывающихся двунаправленных транскриптов, синтезируемых ДНК-вирусами. дцРНК распознаются и процессируются белками DCL в первичные малые интерферирующие РНК вирусного происхождения, vsiRNA (virus-derived small interfering RNA). Эндогенные РНК-зависимые РНК-полимеразы (RDR) используют одноцепочечные вирусные РНК для синтеза двуцепочечных форм с последующим их процессингом до вторичных vsiRNA и усилением противовирусного ответа. Установление системного противовирусного иммунитета требует амплификации vsiRNA, межклеточного и системного распространения сигналов сайленсинга (Ding and Voinnet, 2007; Szittyá and Burguán, 2013). Модельное растение *Arabidopsis thaliana* кодирует четыре DCL, пять DRB, десять AGO и шесть RDR, которые участвуют в различных путях, связанных с РНКи (Vaucheret et al., 2001). DCL1 участвует в процессинге miRNA, тогда как DCL2, DCL3 и DCL4 процессируют длинные молекулы дцРНК различного происхождения на siRNA длиной 22, 24 и 21 нуклеотид, соответственно (Bartel, 2004; Brodersen and Voinnet, 2006). На инфекции РНК-вирусов влияют DCL3, DCL4 и DCL2, а DCL3 также имеет решающее значение в процессе РНКи против ДНК-вирусов, предположительно, действуя через индукцию метилирования ДНК (Delelis et al., 2006; Qu et al., 2008; Garcia-Ruiz et al., 2010; Raja et al., 2014; Csorba et al., 2015). DCL1 действует как положительный регулятор

продукции *vs*iRNA, делая вирусные дцРНК доступными для других DCL как при инфекциях РНК-, так и ДНК-вирусов (Blevins et al., 2006). Белки DCL взаимодействуют с белками DRB для процессинга дцРНК и продукции *vs*iRNA. DRB4 является партнером DCL4 и важен для противовирусной защиты против РНК-вирусов TYMV и TCV (Curtin et al., 2008; Jakubiec et al., 2012). DCL3 взаимодействует с DRB3 и AGO4, и этот белковый комплекс участвует в репрессивном метилировании геномов геминивирусов (Raja et al., 2014). Белок HEN1 также необходим для противовирусной защиты, он участвует в метилировании и стабилизации *vs*iRNA. Репликазный белок 126 кДа ВТМ ингибирует активность HEN1, таким образом подавляя РНКи (Vogler et al., 2007). Роль белков AGO арабидопсиса также описана в противовирусной защите как от РНК-, так и от ДНК-вирусов. Примеры противовирусной активности AGO1 и AGO2 показаны в отношении многих РНК-вирусов TCV, CMV, TuMV, PVX и TBSV (Harvey et al., 2011; Jaubert et al., 2011; Scholthof et al., 2011; Carbonell et al., 2012). Считается, что AGO1 является сенсором инфекции в клетке, индуцирующим противовирусный ответ через активацию AGO2, поскольку (i) при вирусной инфекции нарушается гомеостаз AGO1 в клетке за счет ингибирования его трансляции (Várallyay et al., 2010) и (ii) AGO1 является негативным регулятором AGO2, и в его отсутствие уровни AGO2 повышаются, что приводит к активации РНКи (Harvey et al., 2011). AGO5, AGO7 и AGO10 также необходимы для становления противовирусных ответов РНКи при инфекциях РНК-вирусов, но, вероятно, играют минорную роль в различных органах. Возможно, действие этих AGO скоординировано с другими белками семейства в пространстве и времени. Их противовирусная активность описана в отношении CMV, TCV и TuMV (Qu et al., 2008; Takeda et al., 2008; Garcia-Ruiz et al., 2015). Роль AGO4 в установлении антивирусного сайленсинга в отношении геминивирусов, как упоминалось выше, состоит в ингибировании транскрипции через метилирование вирусной ДНК (Raja et al., 2008, 2014).

Во многих комбинациях растение-вирус активность RDR способствует усилению противовирусного ответа при достижении системного защитного иммунитета (Dalakouras et al., 2020). Белки RDR запускают так называемую амплификацию антивирусного ответа (Csorba et al., 2015). Активность клеточных полимераз RDR стимулируется наличием aberrantных РНК, у которых отсутствуют такие характеристики зрелых мРНК, как 5'-кэп-структура или 3'-поли(А)-хвост (Gazzani et al., 2004). siRNA длиной 22 нт, процессируемые DCL2, являются ключевым индуктором запуска продукции вторичных siRNA. 22 нт-siRNA связываются с AGO1, что, вероятно, приводит к конформационным изменениям белка и последующему привлечению RDR6 к целевой РНК для

полимеризации второй цепи и продукции вторичных siRNA. Такое явление получило название транзитивного сайленсинга (transitive silencing) (Mlotshwa et al., 2008; Chen et al., 2010; McHale et al., 2013). Считается, что вторичные siRNA, как и длинные молекулы РНК, способны перемещаться между клетками через плазмодесмы и по сосудистой системе в дистальные части растения – этот феномен получил название системного сайленсинга. Транзитивный и системный сайленсинг приводит к «иммунизации» отдаленных частей растения через индукцию РНКи (Voinnet and Baulcombe, 1997; Csorba et al., 2015; Dalakouras et al., 2020).

Вирусные супрессоры РНКи

РНКи – защитный механизм растения, направленный на подавление амплификации вирусного генома и распространения инфекции по ткани и всему растению. Чтобы преодолеть эту линию защиты, вирусы развили механизмы, позволяющие избегать и/или противодействовать РНКи. Вирусы способны индуцировать образование мембранных субклеточных структур, или сферул (Schwartz et al., 2002; Laliberté and Sanfaçon, 2010; Laliberté and Zheng, 2014). Такие структуры, включающие в себя мембраны ядра, эндоплазматического ретикулума, пероксисом, митохондрий или хлоропластов, используются для образования и/или транспорта VRC (Laliberté and Sanfaçon, 2010; Laliberté and Zheng, 2014). Другим способом противодействия РНКи и защиты вирусных транскриптов от деградации и инактивации, прежде всего, являются вирусные белки, называемые вирусными супрессорами сайленсинга, VSR (viral suppressors of RNA silencing) (Burgyán and Havelda, 2011; Csorba et al., 2015). Изучение этих вирусных белков началось с исследования синергизма потивирусов с другими вирусами. Было показано, что 5'-проксимальный регион потивирусных геномов, кодирующий белок p1 (protease-1), именуемый HcPro (helper component protease), приводит к резкой стимуляции инфекции ХВК в условиях ко-инокуляции, характеризующейся увеличением тяжести симптомов и интенсивным накоплением вирусного потомства. (Vance et al., 1995; Pruss et al., 1997). HcPro изолирует vsiRNA, что впоследствии нарушает сборку активного комплекса RISC (Lakatos et al., 2006). Еще одно раннее исследование показало, что белок 2b CMV способствует гипервирулентности через супрессию активности комплекса RISC посредством физического взаимодействия с AGO1 (Ding et al., 1996; Diaz-Pendon et al., 2007; Duan et al., 2012). Оба белка, HcPro и 2b, необходимы для накопления вирусных частиц, перемещения на большие расстояния, блокируют PTGS и являются факторами вирулентности. С тех пор было обнаружено и охарактеризовано множество VSR у различных вирусов (Csorba et al., 2015).

VSR представляют собой филогенетически не связанные, в основном многофункциональные белки. Одна из стратегий, используемых VSR, состоит в том, чтобы препятствовать установлению противовирусной РНКи путем блокировки этапа инициации. Активность VSR описана в отношении (i) нарушения биогенеза vsiRNA, (ii) секвестрации дцРНК различной длины, (iii) содействия дестабилизации белка AGO до образования RISC или (iv) транспортировки мобильного сигнала сайленсинга в пероксисомы для отключения защитного механизма (Csorba et al., 2015; Incarbone et al., 2017; Gaffar and Koch, 2019). Кроме того, многие VSR играют ключевую роль в репликации, сборке или перемещении вирусов (Moon and Park, 2016; Huang et al., 2023). Например, репликазные белки тобамовирусов обладают активностью VSR. Белки репликазы 126 кДа ВТМ и 125 кДа ORMV ингибируют активность HEN1, что нарушает метилирование siRNA и приводит к супрессии РНКи (Ding et al., 2004; Vogler et al., 2007; Malpica-López et al., 2018). 122 кДа репликазный белок ВТМ крестоцветных, крВТМ (crucifer-infecting Tobacco mosaic virus), связывает дцРНК, siRNA и miRNA, что препятствует активации сборки комплекса RISC (Csorba et al., 2007). Более того, белок 122 кДа крВТМ, как и некоторые другие белки различных вирусов, способны индуцировать накопление в клетке miRNA168. В растениях, инфицированных вирусом, повышенный уровень накопления miRNA168 коррелирует с индукцией экспрессии *AGO1*, но с пониженным уровнем накопления белка *AGO1*, что, вероятно, связано с трансляционной репрессией последнего (Várallyay et al., 2010; Várallyay and Havelda, 2013).

Как было описано выше, транспортные белки тобамовирусов способны подавлять РТИ, индуцируемый дцРНК вирусного происхождения (Huang et al., 2023). На основании многофункциональности репликазных и транспортных белков тобамовирусов, авторы предлагают модель стратегии эффективного развития вирусной инфекции (рис. 2). Данная модель описывает транспортные и репликазные белки как вирусные эффекторы вирулентности. Транспортные белки, обладая, с одной стороны, функцией связывания вирусной РНК и ее транспортировки из клетки в клетку, с другой стороны, выступают в качестве эффектора вирулентности на лидирующем фронте инфекции для подавления РТИ, индуцированного вирусной дцРНК. Репликазные белки выступают в качестве эффектора вирулентности в центре очага инфекции, обладая функцией VSR, и подавляют антивирусную РНКи, вызванную дцРНК (Huang et al., 2023).

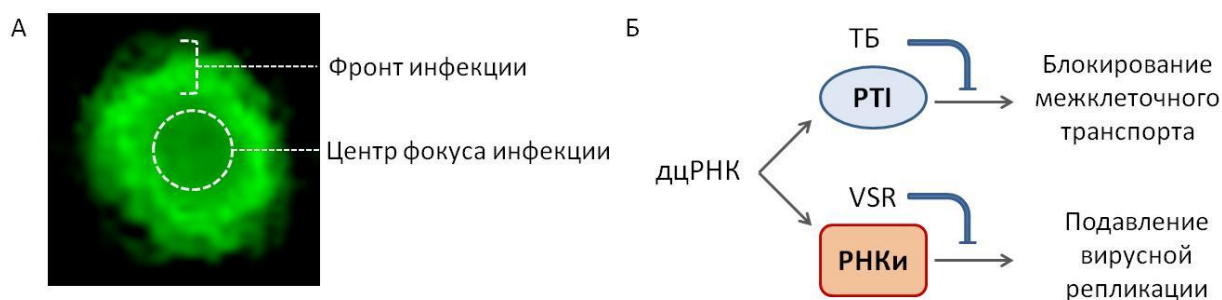


Рисунок 2. Противодействие многофункциональных белков тобамовирусов защитным реакциям растения. А – Очаг инфекции ВТМ в листе *N. benthamiana*, инфицированного вирусным вектором TMV:GFP, в котором ген белка оболочки заменен на GFP, на 4 день после инфильтрации. Обозначен передний фронт инфекции и центр очага инфекции. Место заражения на инокулированном листе визуализировано с помощью ручной камеры и УФ-лампы. Б – схематическое изображение действия факторов вирулентности тобамовирусов. дцРНК вирусного происхождения индуцирует защитные механизмы растения, РТІ (PAMP-triggered immunity) и РНКи (РНК интерференция). Транспортный белок (ТБ) тобамовирусов, проявляя активность на переднем фронте инфекции, активирует межклеточный транспорт за счет подавления защитных ответов РТІ, что приводит к распространению инфекции по ткани. Репликазные белки тобамовирусов проявляют активность VSR в центре очага инфекции, подавляя РНКи, что приводит к эффективной продукции вирусного потомства. Адаптировано из (Huang et al., 2023).

Клеточные факторы в системе взаимодействий вирус-растение

Практически все вирусные белки обладают мультифункциональной активностью. Основная функция того или иного вирусного фактора, например, репликазы, ТБ, БО вируса, бесспорна и доказана множеством исследований, но выявление других функциональных активностей каждого из них требует глубоких исследований, поскольку вирусу на пути к успешному размножению требуется преодолеть множество защитных реакций и столкнуться с десятками клеточных факторов, обладающих в нормальных условиях одними функциями, а в условиях стресса другими. Как упоминалось выше, белки вируса взаимодействуют с клеточными белками, что может иметь как позитивные, так и негативные последствия для развития вирусной инфекции. Множество исследований описывают взаимодействие белков репликативного комплекса и БО с отдельными клеточными факторами. Однако наибольшее количество клеточных партнеров идентифицировано именно для ТБ тобамовирусов. По-видимому, это связано не только с мультифункциональностью данного белка, но и с тем, что этот белок широко используется в качестве агента для изучения межклеточного транспорта в растениях. Долгая история изучения межклеточного транспорта тобамовирусов показывает, что по мере совершенствования методологической базы появляются данные, корректирующие

или опровергающие прежние представления о функции и механизмах действия вирусных факторов. Далее приведен анализ и систематизация современных представлений о выявленных в исследованиях ближнего транспорта тобамовирусов клеточных факторах, а именно, о партнерах ТБ.

Врожденный иммунитет и РНКи, как правило, действуют на начальных этапах инфекции (Mandadi and Scholthof, 2013; Moon and Park, 2016; Calil and Fontes, 2017; Gouveia et al., 2017; Wu et al., 2019). Преодолев эту линию защитных реакций, вирусные белки встречаются со множеством клеточных факторов, роль которых в описанных выше иммунных ответах не определена, либо они являются участниками иных ответов в системе взаимодействий вирус-растение. Множество исследований описывает эти клеточные факторы как белки с провирусной или антивирусной активностью (Garcia-Ruiz, 2018; Garcia- Ruiz, 2019). Провирусные факторы хозяина необходимы для прохождения основных этапов цикла инфекции и работают синхронно с вирусными факторами. Напротив, противовирусные факторы хозяина нацелены на вирусные нуклеиновые кислоты или белки для установления защитных реакций или торможения репродукции вируса (рис. 3).



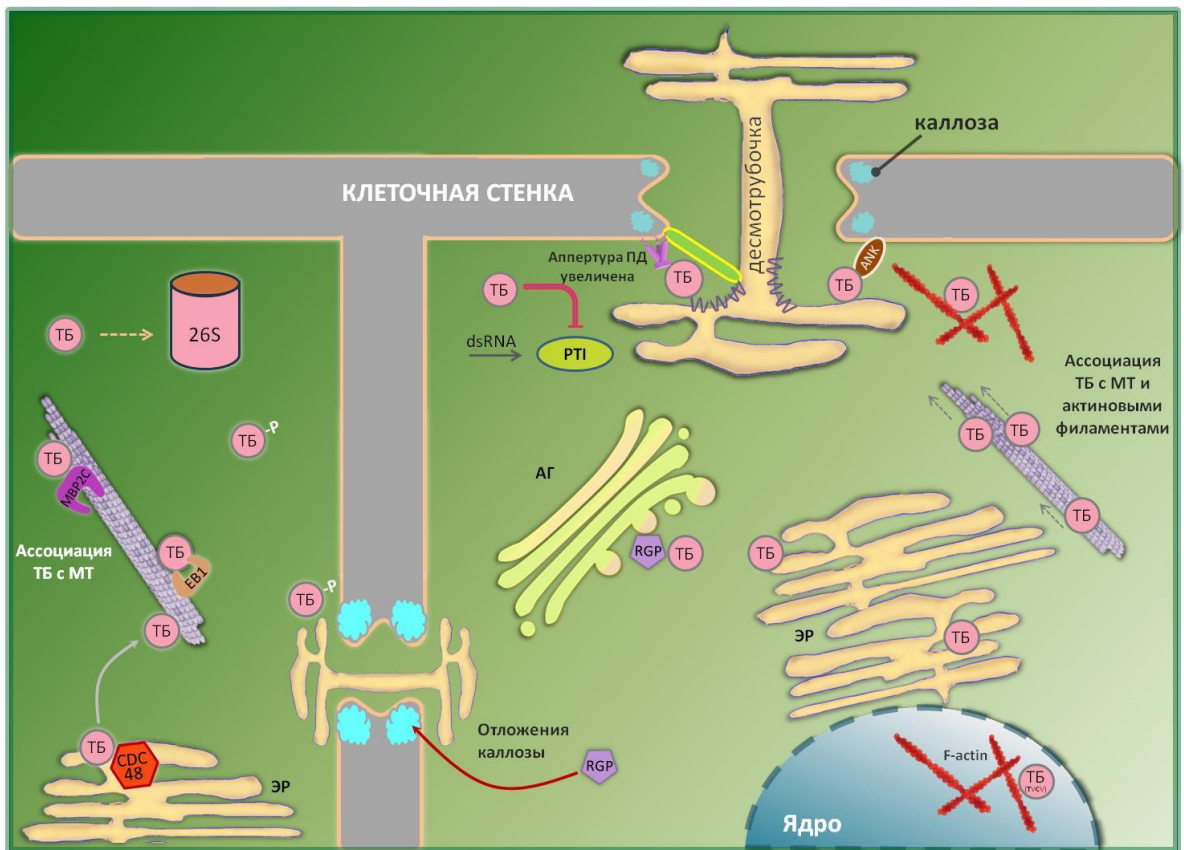
Рисунок 3. Блок-схема, описывающая взаимодействие мультифункциональных вирусных белков с анти- и провирусными клеточными факторами. В результате взаимодействия вирусных и клеточных белков происходит подавление или активация защитных ответов клетки, что способствует активной вирусной репродукции или подавлению последней, соответственно. Avr, вирусный фактор авирулентности; Vir, вирусный фактор вирулентности.

ТБ ВТМ широко используется в качестве маркера плазмодесм. ТБ ВТМ способен увеличивать пропускную способность ПД. Однако, пока нет доказательств прямого взаимодействия ТБ с компонентами ПД, приводящего к увеличению аппертуры (Reagan and Burch-Smith, 2020). Последние данные свидетельствуют о том, что ТБ первоначально взаимодействует с факторами, которые затем влияют на конформацию ПД. К таким

факторам можно отнести белки, ассоциированные с плазмодесмами (Dorokhov et al., 2019), которые впоследствии напрямую или опосредованно влияют на метаболизм каллозы вокруг ПД (Amsbury et al., 2018). ТБ ВТМ является мультифункциональным белком, главная функция которого – обеспечение межклеточного транспорта вирусной РНК. Помимо локализации в ПД, показано, что ТБ ВТМ связан с мембранами ЭР, актиновыми филаментами и микротрубочками (Peña and Heinlein, 2012; Peiró et al., 2014). Предполагается, что ТБ ре-локализуется из ПД на микротрубочки на более поздних этапах инфекции, поскольку его транспортная функция не является существенной на данном этапе. Протеасомная деградация ТБ может служить способом регуляции количества ТБ во время развития инфекции (Niehl et al., 2012). Эти механизмы могут представлять собой пример «эксплуатации» клеточных систем вирусом для более успешного развития инфекции (рис. 4).

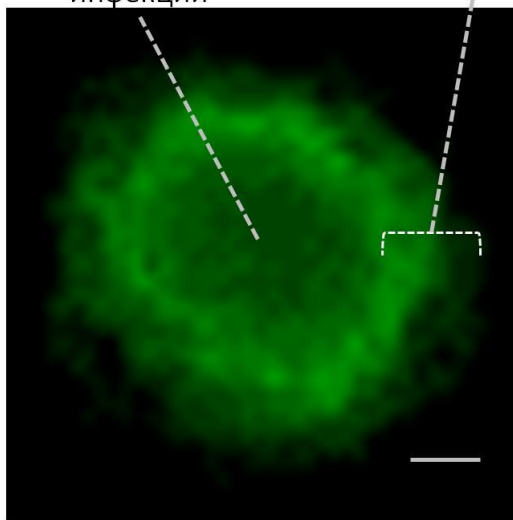
Для реализации своих функций ТБ ВТМ взаимодействует с различными клеточными компонентами, среди которых белки цитоскелета, актин и миозины, мембранные компоненты и шапероны эндоплазматического ретикулума, такие клеточные факторы, как пектинметилэстераза, протеин киназы, белки мембранных контактных сайтов, ЭР и плазматической мембраны. Более того, тобамовирусные ТБ взаимодействуют с малой субъединицей RUBISCO (Zhao et al., 2013) и компонентами ядра (Levy et al., 2013; Levy, 2015).

Множество опубликованных исследований посвящено различным клеточным факторам, участвующим как во внутри- так и в межклеточном транспорте нуклеопротеида тобамовируса, целью которых является определение функции ПД и механизмов межклеточного транспорта макромолекул в растениях. Долгая история изучения межклеточного транспорта тобамовирусов показывает, что по мере совершенствования методологической базы появляются данные, корректирующие или опровергающие прежние представления о функции и механизмах действия вирусных факторов. Например, изначально полагалось, что ТБ ВТМ является интегральным мембранным белком ЭР с двумя трансмембранными доменами, соединенными гидрофильной петлей, экспонированной в люмен (Brill et al., 2000; Fujiki et al., 2006). Впоследствии, эта топологическая модель была скорректирована, и показана тесная периферическая ассоциация ТБ с мембранами ЭР со стороны цитоплазмы (Peiró et al., 2014).



Поздняя стадия
инфекции

Ранняя стадия инфекции













-  - каллоза
-  - ТБ (транспортный белок вируса)
-  - RGP (reversible glycosylated polypeptide)
-  - SYT1 (synaptotagmin A)
-  - REM (remorin)
-  - ANK (ankyrin)
-  - RTN3/6 (reticulon-like protein B3/6)
-  - MBP2C (microtubule binding protein 2C)
-  - EB1 (end binding protein 1)
-  - CDC48 (cell division cycle protein 48)

Рисунок 4. Схематическое представление взаимодействий транспортного белка тобамовирусов с клеточными факторами во время ранней (на лидирующем фронте очага) и поздней (в центре очага) стадиях инфекции. Показан очаг инфекции ВТМ в листе *N. benthamiana*, инфицированного вирусным вектором TMV:GFP, в котором ген белка оболочки заменен на GFP, на 4 день после инфильтрации. Обозначен лидирующий фронт (ранняя стадия) инфекции и центр очага (поздняя стадия) инфекции. Место заражения на инокулированном листе визуализировано с помощью ручной камеры и УФ-лампы. Шкала 200 мкм. ПД – плазмодесма; ЭР – эндоплазматический ретикулум; АГ – аппарат Гольджи; МТ – микротрубочки; РТИ - PAMP-triggered immunity.

Белки цитоскелета

Цитоскелет и ЭР представляют собой динамичную сеть, которая участвует во многих клеточных процессах, в том числе и во внутриклеточном секреторном транспорте (Ueda et al., 2010; Wang et al., 2018). Мембранная система ЭР использует цитоскелет для регулирования многих физиологических процессов, в том числе и для доставки белков на периферию клетки и в ПД. Цитоскелет состоит из микротрубочек и актиновых филаментов и играет жизненно важную роль в поддержании клеточной структуры, внутри- и межклеточного транспорта белков и сигнальных молекул (Wang and Mao, 2019). Понимание того, как ТБ ВТМ взаимодействует с цитоскелетом клетки и белками, связанными с цитоскелетом, необходимо для понимания механизмов, лежащих в основе инфекции и распространения ВТМ. ТБ ВТМ взаимодействует с микротрубочками и актиновыми филаментами цитоскелета клетки, а структурные и связанные с ним белки обеспечивают внутри- и межклеточный транспорт вируса во время инфекции. Эти взаимодействия имеют решающее значение для внутриклеточного транспорта вирусной РНК к ПД.

Микротрубочки и тубулин. Микротрубочки представляют собой цилиндрические структуры, состоящие из тубулина, и играют ключевую роль во внутриклеточном транспорте и делении клеток (Sedbrook, 2004). Ранние исследования внутриклеточного транспорта вирусов в основном фокусировались на изучении связи между ТБ ВТМ и микротрубочками (McLean et al., 1995; Heinlein et al., 1998). Сообщалось, что связывание ТБ с микротрубочками происходит, благодаря наличию у ТБ тубулин-подобных мотивов, похожих на те, за счет которых формируются контакты между профиламентами микротрубочек (Ashby et al., 2006) (Boyko et al., 2000a). Была выдвинута гипотеза, что динамика микротрубочек на переднем крае инфекции способствует внутриклеточному транспорту ТБ или комплексу ТБ с РНК к ПД (Boyko et al., 2000b, 2007). В пользу этой гипотезы, линии табака с дефектной динамикой микротрубочек демонстрируют сниженную восприимчивость к инфекции ВТМ (Ouko et al., 2010).

Однако некоторые исследования оспаривают важность взаимодействия ТБ и микротрубочек для перемещения ТБ и комплекса ТБ с РНК. Например, нарушение структуры микротрубочек или полимеризации тубулина с помощью различных веществ, а также индукция сайленсинга гена тубулина не влияли на межклеточное перемещение ВТМ, а мутации в гене ТБ ВТМ, приводившие к снижению сродства к микротрубочкам, не препятствовали распространению вируса (Gillespie et al., 2002). Было

продемонстрировано, что ингибиторы полимеризации микротрубочек, колхицин и оризалин, не предотвращают внутриклеточное перемещение ТБ к ПД (Wright et al., 2007). Однако экспериментальный подход, основанный на фармакологических ингибиторах, был оспорен, и независимый от микротрубочек внутриклеточный транспорт ТБ был поставлен под сомнение (Seemanpillai et al., 2006). Тем не менее, общепризнанно, что взаимодействие ТБ и микротрубочек играет важную роль в локальном распространении ВТМ, но, возможно, не является необходимым для опосредования перемещения ТБ к ПД (Liu and Nelson, 2013). На поздних стадиях инфекции ТБ ВТМ ассоциирован с микротрубочками, но остается неподвижным. Возможно, таким образом ТБ ВТМ направляется по пути деградации, даже если он не убиквитинирован (Ashby et al., 2006).

Белок 2С, ассоциированный с микротрубочками (МРВ2С). В *N. tabacum* был найден ассоциированный с микротрубочками белок 2С (МРВ2С), с которым связывается ТБ (Kragler et al., 2003). Для выяснения роли этого взаимодействия в развитии инфекции был исследован как эффект повышенной экспрессии (Kragler et al., 2003), так и проведен нокдаун гена *МРВ2С* с помощью вирус-индуцируемого сайлесинга генов (VIGS, virus-induced gene silencing) (Curin et al., 2007). Показано, что транзientная суперэкспрессия *МРВ2С* отрицательно влияет на межклеточный транспорт ТБ в *N. benthamiana*, снижая в два раза эффективность перехода ТБ из клетки в клетку. Также менялась внутриклеточная локализация ТБ: наблюдалось перераспределение белка в область микротрубочек и снижение его концентрации в районе плазмодесм (Kragler et al., 2003). Однако, неожиданным явился тот факт, что подавление экспрессии МРВ2С не оказало влияния ни на межклеточный транспорт ТБ, ни на распространение инфекции ВТМ. Хотя, как и при суперэкспрессии, в условиях нокдауна МРВ2С наблюдалось отчетливое изменение внутриклеточного распределения ТБ. При сниженной экспрессии МРВ2С ТБ практически полностью перераспределялся в область плазмодесм, теряя колокализацию с микротрубочками (Curin et al., 2007). Согласно предложенной авторами модели МРВ2С «задерживает» ТБ на микротрубочках, препятствуя таким образом его перемещению в область ПД, что влечет за собой снижение эффективности межклеточного транспорта. Позже были получены дополнительные данные, свидетельствующие в пользу такой модели. Было продемонстрировано, что трансгенно экспрессируемый гомолог *МРВ2С* из *Arabidopsis thaliana*, слитый с GFP, GFP-AtМРВ2С, придает устойчивость растению к тобамовирусной инфекции ORMV (Ruggenthaler et al., 2009).

Таким образом, согласно вышеприведенным данным, МРВ2С представляет собой клеточный фактор, повышение концентрации которого в клетке приводит к устойчивости

к тобамовирусной инфекции. Однако, отсутствие стимулирующего эффекта на развитие инфекции в условиях подавления экспрессии MPB2C не позволяет однозначно отнести этот клеточный фактор к антивирусным.

Предполагается, что MPB2C, является конститутивно экспрессируемым белком, участвующим в таргетинге к плазмодесмам различных молекул, в том числе белков, синтезируемых в одной клетке и проявляющих свою функцию в другой (NCAP, non-cell autonomous protein). На фоне вирусной инфекции, в том числе тобамовирусной, показано накопление этого белка в инфицированных тканях. Но открытым остался вопрос об уровнях экспрессии *MPB2C* на различных этапах инфекции, особенно различия между лидирующим краем и внутренней областью фокуса инфекции ВТМ. Также возникает вопрос, индуцируется или подавляется экспрессия *MPB2C* на начальных стадиях вирусной инфекции. К примеру, если на лидирующем крае инфекции уровень MPB2C низкий или сравнимый с уровнем в клетках интактного листа (т.е. базовым уровнем), то негативного эффекта на транспорт вируса белок не оказывает, в то время как внутри очага уровень MPB2C может быть повышен, что приводит к снижению эффективности ближнего транспорта и релокализации или «задерживанию» ТБ на микротрубочках (Heinlein et al., 1998). Накопление MPB2C в центре очага может способствовать репликации вируса, в которой принимает участие ТБ. А пониженный или базовый уровень на переднем крае, вероятно, способствует или не препятствует корректному внутриклеточному перемещению ТБ к ПД, соответственно. Функция этого фактора может быть дуальной: повышенные количества в очаге способствуют репликации, а пониженные уровни на лидирующем крае – межклеточному транспорту вируса. Таким образом, связывание ТБ с MPB2C важно в пространстве и времени, возможно, при помощи этого белка происходит переключение функциональной активности ТБ.

Белок EBP1, связывающий микротрубочки. EBP1 еще один белок, ассоциированный с микротрубочками, для которого показана колокализация и взаимодействие *in vivo* и *in vitro* с ТБ ВТМ. Транзистентная суперэкспрессия *AtEBP1:GFP* приводит к снижению эффективности межклеточного транспорта ВТМ (Brandner et al., 2008). В листьях с повышенной экспрессией *AtEBP1:GFP* ТБ локализуется в ассоциации с микротрубочками на переднем крае инфекции, что вполне может быть следствием взаимодействия этих белков. Потенциально MPB2C и EBP1 могут совместно играть роль в регуляции функций ТБ ВТМ.

Актин. Актиновые филаменты необходимы для поддержания формы клетки и обеспечения внутриклеточного транспорта. Было показано, что ТБ ВТМ взаимодействует с актиновыми филаментами и колокализуется с актином в инфицированных клетках (McLean et al., 1995; Hofmann et al., 2009). Это взаимодействие нарушает нормальную организацию актиновых филаментов, часто приводя к образованию плотных сетей актина, которые способствуют межклеточному транспорту вируса. Такая перестройка актиновых нитей имеет решающее значение для эффективного распространения ВТМ внутри растения (Su et al., 2010). Важная роль актиновых филаментов была показана для ТБ TVCV. В отличие от ТБ ВТМ транспортный белок TVCV не связан с микротрубочками. Вместо этого ТБ TVCV проникает в ядро и взаимодействует там с филаментами F-актина, ассоциированными с хроматином. Внутри ядра ТБ TVCV колокализуется с гистоном H2B, а колокализации с ядрышками или тельцами Кахаля обнаружено не было (Levy et al., 2013). Эти результаты свидетельствуют о том, что ТБ TVCV может напрямую влиять на динамику ядерного актина, изменяя экспрессию генов, что потенциально может увеличивать вирулентность TVCV. Показано, что такие взаимодействия необходимы для эффективного локального распространения TVCV и системного заражения *N. benthamiana* and *A. thaliana* (Levy et al., 2013; Levy, 2015).

Моторные белки. Моторные белки, такие как кинезин, динеин и миозин, отвечают за транспортировку внутриклеточных компонентов по микротрубочкам и актиновым филаментам. ТБ ВТМ взаимодействует с этими моторными белками, и они вовлекаются в различные стадии перемещения вируса. Миозины XI-2 и XI-K имеют решающее значение для внутриклеточного перемещения ВТМ, участвуя в транспорте, связанном с ЭР (Harries et al., 2009; Amari et al., 2014). А миозины VIII-1, VIII-2 и VIII-B вовлечены в транспорт ТБ ВТМ к ПД (Amari et al., 2014).

Подводя итог, можно сказать, что взаимодействие ТБ ВТМ с цитоскелетом является важнейшим аспектом перемещения и патогенности вируса. Связываясь с микротрубочками, актиновыми филаментами и моторными белками, ТБ облегчает транспорт вирусной РНК к плазмодесмам и ее последующий переход в соседние клетки. Более того, ТБ TVCV проникает в ядро, где ассоциируется с F-актином и гистоном H2B, что, как предполагается, влияет на ядерную динамику и, возможно, на экспрессию генов. Эти взаимодействия не только способствуют эффективному распространению тобамовирусов внутри растения, но и иллюстрируют сложные стратегии, которые вирусы используют для эксплуатации функционала клетки. Поэтому компоненты цитоскелета, несомненно, можно рассматривать как клеточные факторы, необходимые для вирусной

инфекции, то есть провирусные. Однако некоторые компоненты, например, МРВ2С и ЕВР1, возможно, не являются стимуляторами вирусной инфекции, а скорее регуляторами, которые опосредуют переключение между различными стадиями процесса инфекции.

Белки мембранных контактных сайтов

Мембранные контактные сайты (МКС) — это области, где мембраны различных органелл или клеточных компартментов физически взаимодействуют, но не сливаются (Baillie et al., 2020). Эти участки были впервые охарактеризованы из-за их критической роли в невезикулярном транспорте малых молекул, липидов и внутриклеточном обмене ионами кальция (Burgoyne et al., 2015; Bayer et al., 2017; Petit et al., 2019). МКС содержат определенный набор белков и липидов, которые имеют решающее значение для гибкости мембраны, они служат местом сборки регуляторных белковых комплексов (Prinz, 2014). Специализированные МКС между ЭР и плазматической мембраной (ПМ) считаются структурными компонентами ПД: десмотрубочка, непрерывно проходящая через канал ПД, тесно прилегает к ПМ (~10 нм) и «связана» с каналом спицеподобными белками, идентичность и функции которых являются предметом многих исследований (Tilsner et al., 2011, 2016; Brault et al., 2019). В соответствии с существующими моделями транспорт молекул через ПД происходит через цитоплазматический просвет между ПМ и десмотрубочкой, и каллоза, окружающая канал, является одним из основных регуляторов размера этого просвета. Однако выявление все большего количества участников регуляции проницаемости ПД и белков, связанных с формированием МКС в ПД, говорит о существенной роли МКС в формировании, изменении формы и правильном функционировании ПД (Tilsner et al., 2016; Brault et al., 2019). В контексте вирусной инфекции МКС между ЭР и ПМ в области ПД, рассматриваются как структуры, используемые вирусами как для транспорта, так и для репликации. Было идентифицировано несколько белков, участвующих в поддержании МКС (Levy and Tilsner, 2020). Среди них есть белки, которые, как было показано, взаимодействуют с ТБ тобамовирусов.

Synaptotagmin A (SYTA, SYT1). Синаптотагмин А *A. thaliana* (SYTA, или SYT1) является членом большого семейства синаптотагминов (SYT), гомологи которых присутствуют у всех эукариот. SYT1 регулирует эндоцитоз и участвует в рециркуляции эндосомальных везикул во время вирусной инфекции. Он участвует в формировании участков контакта ЭР-ПМ, являясь одним из «связывающих» белков (Tilsner et al., 2016; Pankratenko et al., 2020). Продемонстрировано, что два других синаптотагмина, SYT5 и

SYT7, взаимодействуют с SYT1 и также необходимы для формирования контакта ЭР-ПМ (Ishikawa et al., 2020). Большинство МКС, содержащих SYT, локализируются в районе ПД (Levy et al., 2015; Ishikawa et al., 2020). Было показано, что SYT1 является клеточным фактором, взаимодействующим с ТБ ВТМ и способствующим его накоплению в ПД. Подавление межклеточного транспорта ТБ ВТМ было продемонстрировано в трансгенной линии *A. thaliana* с подавленной экспрессией *SYT1* и в растениях *N. benthamiana* с транзientной экспрессией доминантно-негативного мутанта *SYTA* (Lewis and Lazarowitz, 2010). Позднее было показано, что ТБ ВТМ и ТБ TVCV напрямую взаимодействуют с SYT1, при этом SYT1 необходим для доставки этих ТБ в ПД (Uchiyama et al., 2014). Более того, показано, что первые 50 N-концевых аминокислотных остатков ТБ ВТМ, распознаваемых как его сигнал локализации в ПД (PLS, plasmodesmata-localization signal) (Yuan et al., 2016), необходимы и достаточны для взаимодействия с SYT1 и для локализации ТБ в ПД (Yuan et al., 2018). Однако, чуть позднее та же группа исследователей идентифицировала два дополнительных домена ТБ, содержащих аминокислотные остатки с 61 по 80 и с 147 по 170, которые отвечают за локализацию ТБ в ПД вместе с основным сигналом PLS (Liu et al., 2020). Из этих двух доменов первый (61-80), как было показано, взаимодействует с SYT1. Другое исследование продемонстрировало важную роль трех синаптоагминов, SYT1, SYT5 и SYT7, в формировании МКС между ЭР и ПМ, особенно в области ПД, и их значение для перемещения вируса от клетки к клетке. В тройном мутанте арабидопсиса *syt1/syt5/syt7* ТБ YoMV, слитый с GFP, не локализовался в ПД, и его межклеточный транспорт был резко снижен по сравнению с транспортом в растениях дикого типа. Интересно, что одиночные мутанты *syt1*, *syt5* или *syt7* поддерживали эффективное развитие инфекции YoMV, как и растения дикого типа, в то время как двойные и тройные мутанты были менее толерантны к вирусу (Ishikawa et al., 2020). SYT1 не является необходимым для межклеточного транспорта традиционно секретируемых белков (Thomas et al., 2008; Levy et al., 2015; Ishikawa et al., 2020), но необходим для локализации тобамовирусных ТБ в ПД.

Таким образом, согласно имеющимся данным, SYT1 используется тобамовирусами для обеспечения локализации ТБ в ПД и необходим для продуктивной инфекции ВТМ и TVCV.

Реморины. В плазматических мембранах растений и ПД обнаруживаются белки реморины (REM), для которых характерна локализация в липидных нанодоменах, обогащенных стеролами и фосфолипидами (Gronnier et al., 2017). Семейство реморинов представлено белками, регулирующими апертуру и функциональность плазмодесм и

заякоренными в плазматической мембране растений (Jarsch and Ott, 2011; Perraki et al., 2018; Gouguet et al., 2021). Они играют важную роль в ответах растений на различные стрессовые воздействия, в т.ч. на вирусную инфекцию (Raffaele et al., 2009; Perraki et al., 2014; Sasaki et al., 2018). Реморины *N. benthamiana*, принадлежащие к группе 1, пальмитоилированы и локализованы в ПМ (Ma et al., 2022). Из четырех выбранных для анализа NbREM группы 1 (NbREM1.1, 1.3, 1.5, 1.8) только реморин NbREM1.5 продемонстрировал влияние на ближний транспорт TMV:GFP: сверхэкспрессия *NbREM1.5* подавляла транспорт TMV:GFP, в то время как его нокдаун приводил к стимуляции межклеточного транспорта TMV:GFP (Ma et al., 2022). Мутантные варианты NbREM1.5, лишенные пальмитата, накапливались на более низких уровнях и не влияли на опосредованный ТБ межклеточный транспорт репортерной молекулы, поэтому эта модификация считается необходимой для функционирования NbREM1.5. Помимо прямого взаимодействия с ТБ ВТМ, NbREM1.5 стимулировал отложение каллозы вокруг ПД. Таким образом, авторы предполагают, что существует два механизма, лежащих в основе способности NbREM1.5 ограничивать межклеточный транспорт ВТМ: негативная регуляция пропускной способности ПД путем отложения каллозы и влияние на функционирование ТБ путем взаимодействия с ним (Ma et al., 2022). Несмотря на то, что влияние NbREM1.2 *N. benthamiana* на транспорт ВТМ не исследовано, но охарактеризован NtREM1.2 из *N. tabacum* (Sasaki et al., 2018). NtREM1.2, в отличие от NbREM1.5, стимулирует локальное распространение ToMV при экспрессии в растениях *N. benthamiana*. Более того, показано, что он напрямую взаимодействует с ТБ ToMV в системе бимолекулярной комплементации флуоресценции (BiFC). Важно отметить, что различные члены семейства реморинов оказывают противоположное влияние на вирусный транспорт. Например, StREM1.3 *Solanum tuberosum* препятствует межклеточному транспорту ТБ ВТМ и TGBp1 PVX (Raffaele et al., 2009; Perraki et al., 2014), но стимулирует ближний транспорт TuMV и вируса картофеля А (PVA) (Rocher et al., 2022).

Подводя итог, можно сказать, что реморины, являющиеся белками, локализованными в нанодоменах ПМ, регулируют проницаемость ПД, влияют на отложение каллозы в ПД, играют важную роль в межклеточном транспорте вирусов, в том числе тобамовирусов. Однако из-за различий в эффектах их нельзя однозначно отнести к про- или противовирусным клеточным факторам.

Ретикулоны. Пространство между ПМ и десмотрубочкой в канале ПД заполнено белками, образующими спицеобразные структуры, среди которых обнаружены

синаптотагмины, белки VAP (vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated proteins) и ретикулоны (Schapire et al., 2008; Wang et al., 2014a). Такой обширный белковый каркас десмотрубочки, вероятно, придает этой структуре значительную жесткость, обеспечивая быстрое ремоделирование мембран внутри ПД и облегчая динамический контроль над размером апертуры (Knox et al., 2015; Sun et al., 2019). Ретикулоны (RTN) — это интегральные мембранные белки, которые могут образовывать димеры или олигомеры и, таким образом, создавать локальные напряжения, вызывающие изгибание и формирование мембраны. Члены этого семейства обнаружены у всех эукариот (Yang and Strittmatter, 2007). RTN преимущественно локализованы в ЭР и играют центральную роль в обеспечении правильной морфологии мембран ЭР. Растительные ретикулоны RTN3 and RTN6 были обнаружены в протеоме ПД (Fernandez-Calvino et al., 2011). Они участвуют в образовании десмотрубочки, генерируя уникальную кривизну мембраны в ПД и создавая упорядоченную липидную композицию в мембранных контактах в ПД (Knox et al., 2015; Kriechbaumer et al., 2015). RTN содержат четыре трансмембранных домена, которые образуют два трансмембранных клина, соединенных через цитозольную петлю, причем С- и N-концы белка обращены к цитозолю (Kriechbaumer et al., 2015). Считается, что ретикулоны за счет своей способности сжимать мембраны принимают участие в формировании первичных ПД и десмотрубочки. Однако в зрелых тканях RTN3 and RTN6 также остаются связанными с ПД и колокализуются с ТБ тобамовирусов (Knox et al., 2015; Tilsner and Kriechbaumer, 2022). Среди белков, которые, как было показано, взаимодействуют с RTN3 и RTN6, есть SYT1 и два реморина - REM1.2 и REM1.3 (Kriechbaumer et al., 2015). Таким образом, можно предположить, что ТБ ВТМ, SYT1, RTN и REM могут работать в комплексе, способствуя межклеточному транспорту вируса. Недавно было обнаружено, что RTN3 и RTN6 напрямую взаимодействуют с ТБ ВТМ и ТБ нескольких других вирусов (Tilsner and Kriechbaumer, 2022). Совместная экспрессия *RTN3* с транспортным белком *3a CMV* привела к снижению межклеточного транспорта репортерного белка (GFP). Возможно, взаимодействие между RTN3 и *3a* препятствует выполнению транспортной функции последнего. Авторы полагают, что ретикулоны могут использоваться вирусами с различными целями, включая модификацию архитектуры и состава клеточных мембран для облегчения репликации вируса, транспорта к ПД и через ПД, а также для прямой или опосредованной модификации ПД (Tilsner and Kriechbaumer, 2022). Вопрос о про- или антивирусной роли ретикулонов на данный момент остается открытым.

Белок *N. tabacum*, содержащий анкириновые повторы

В ходе исследования белковых партнеров одного из белков, кодируемых генами тройного блока X вируса картофеля, а именно TGBp2, были идентифицированы три клеточных фактора *N. tabacum* (cv. Samsun NN), участвующих в межклеточном транспорте ХВК по каллоза-зависимому механизму. Они были названы TGBp2-interacting proteins (TIP) 1-3. TIP представляют из себя белки, содержащие анкириновые повторы (ANK-белки) (Fridborg et al., 2003). ANK-белки имеют различные функции в развитии и, в особенности, в биогенезе хлоропластов (Bae et al., 2008; Kim et al., 2014, 2015), а также принимают участие в ответных реакциях на стресс и патогены (Dong, 2004; Yang et al., 2012; Sharma and Pandey, 2015; Hu et al., 2022). Стоит отметить, что ANK-белки часто являются трансмембранными белками, а домены ANK ответственны за белок-белковые взаимодействия (Shen et al., 2010; Zhang et al., 2010). Показано, что ТБ ВТМ взаимодействует с ANK-белком *N. tabacum* cv. Turk, который имеет высокую степень идентичности с TIP1 (Ueki et al., 2010). В трансгенных растениях *N. tabacum* с суперэкспрессией ANK межклеточный транспорт ТБ-YFP происходил эффективней, чем в растениях с нокдауном ANK. Кроме того, ближний транспорт вирусного вектора TMV-DsRed на основе генома ВТМ, в котором ген белка оболочки был заменен на ген флуоресцентного тэга, был более эффективен в растениях с повышенной экспрессией ANK и существенно снижался в растениях с нокдауном ANK. Одновременная экспрессия ТБ и ANK заметно снижала отложения каллозы в районе ПД. Было сделано предположение, что ANK-белки влияют на каллозу, взаимодействуя с бета-1,3-глюканазой (Fridborg et al., 2003). Однако другие авторы опровергали эту гипотезу, основываясь на разной топологии ANK-белка и глюканазы, и предположили, что ANK-белки взаимодействуют с каллоза-синтазами (Ueki et al., 2010). Независимо от лежащего в основе механизма, было явно продемонстрировано, что взаимодействие ANK и ТБ ВТМ способствует межклеточному транспорту вируса. Таким образом, ANK является клеточным белком, используемым ВТМ для эффективного перемещения из клетки в клетку. Это дает возможность утверждать, что ANK является провирусным фактором.

Шапероны и шаперон-подобные белки

Тобамовирусная инфекция вызывает переформатирование эндомембранных систем ЭР для формирования вирусных репликационных фабрик, VRC (Reichel and Beachy, 1998). Кроме того, активный синтез чужеродных для клетки вирусных белков приводит к стрессу ЭР, в результате чего клетка реагирует активацией системы контроля качества

белков и направлением вирусных белков на деградацию в 26S протеасоме по убиквитин-зависимому пути. Более того, показано, что во время HR, опосредованного N белком, происходит повышение регуляции многочисленных резидентных шаперонов ЭР (Caplan et al., 2009; Vègue et al., 2019). Считается, что они играют важную роль в накоплении мембранных и секретируемых белков, участвующих во врожденном иммунитете растений. Кроме того, вирус может активировать убиквитинирование и деградацию некоторых клеточных противовирусных белков (Liu et al., 2002). И, наконец, вирус, вероятно, использует клеточные пути деградации белков для регулирования количества собственных белков на разных стадиях инфекции (Reichel and Beachy, 2000; Alcaide-Loridan and Jupin, 2012; Niehl et al., 2013). Таким образом, система контроля качества ЭР и особенно шапероны играют важную роль во время вирусной инфекции.

MP interacting protein 1 (NtMPIP1). NtMPIP1 относится к семейству шаперонов I типа DnaJ (Shimizu et al., 2009). Показано, что NtMPIP1 напрямую взаимодействует с ТБ ВТМ в дрожжевой двугибридной системе, а также в условиях связывания белков на мембране (overlay assay). Более того, NtMPIP1 является партнером другого белка, NTH201, относящегося к классу II KNOTTED1-подобных белков, который, как было ранее показано, способствует межклеточному распространению ВТМ и колокализуется, но не контактирует с ТБ (Yoshii et al., 2008). Было показано, что ТБ/NtMPIP1/NTH201 взаимодействуют в дрожжевой трехгибридной системе (Shimizu et al., 2009). Таким образом, NtMPIP1, вероятно, служит связующим звеном между ТБ и NTH201. Нокдаун *NTH201* (Yoshii et al., 2008) или *NtMPIP1* (Shimizu et al., 2009) с помощью VIGS приводил к подавлению межклеточного транспорта ВТМ и снижению уровня вирусной РНК. Таким образом, несмотря на совершенно разные функции и природу этих белков (NTH201 представляет собой белок, подобный факторам транскрипции, NtMPIP1 принадлежит к семейству шаперонов DnaJ), оба этих белка можно рассматривать как провирусные клеточные факторы, действующие совместно.

CELL-DIVISION CYCLE protein 48 (CDC48). CDC48 — это шаперон, который играет важную роль в иммунитете растений и является одним из ключевых факторов системы контроля качества белков ЭР (Vègue et al., 2019). CDC48 участвует в ретранслокации белков из ЭР в цитоплазму, направляя их на деградацию, с целью поддержания целостности мембран ЭР при стрессе. Более того, CDC48 был обнаружен среди шаперонов ЭР, участвующих в индуцируемом инфекцией ВТМ HR, опосредованном N белком (Caplan et al., 2009). Было показано, что количество CDC48 повышается при инфицировании ВТМ, а сам CDC48 напрямую взаимодействует с ТБ

BTM *in vitro* и *in vivo* (Niehl et al., 2012). Предполагается, что опосредованная CDC48 транслокация ТБ из VRC на поздней стадии инфекции может быть способом, с помощью которого избыточные для этой стадии количества ТБ направляются по пути деградации в 26S протеасому (UPS) и/или «переключает» его функцию с транспорта на репликацию и продукцию вирионов (Niehl et al., 2012, 2013). Нельзя исключать, что деградация вирусных белков во время развития инфекции может представлять их нормальный физиологический оборот. Как уже было сказано выше, небольших количеств ТБ достаточно для связывания вирусной РНК и ее внутри- и межклеточного транспорта. Таким образом, накопление функционального ТБ необходимо только на переднем крае инфекции (Maule Ph.D. and Palukaitis, 1991; Sheshukova et al., 2020), где он выполняет транспортную функцию. На поздних стадиях инфекции, внутри очага, ТБ остается в ПД, но транспортную функцию не выполняет (Orarka et al., 1997).

Кальретикулин. Кальретикулин (CRT) представляет собой резидентный шаперон ЭР, ответственный за гомеостаз Ca^{2+} и контроль правильного сворачивания белков (Thelin et al., 2011). Кроме того, существуют исследования, сообщающие о том, что некоторые растительные CRT обладают специализированными функциями. Например, CRT3 *A. thaliana* вовлечен в реакции врожденного иммунного ответа, участвуя в распознавании PAMP (Christensen et al., 2010), и отвечает за контроль дефектных форм brassinостероидного рецептора BRI1 в ЭР (Jin et al., 2009). Более того, есть доказательства того, что растительные CRT локализируются в ПД и участвуют в регуляции пропускной способности ПД (Baluska et al., 1999; Laporte et al., 2003; Christensen et al., 2010; Thelin et al., 2011). NbCRT2 и NbCRT3 *N. benthamiana* участвуют в опосредованной N белком защите от BTM: они необходимы для экспрессии рецептороподобной киназы IRK, которая необходима для HR (Caplan et al., 2009b). CRT был выделен из *N. tabacum* как белок, взаимодействующий с ТБ BTM (Chen et al., 2005). Кроме того, показано, что CRT2 *A. thaliana* колокализуется с ТБ в ПД, AtCRT1a взаимодействует с ТБ в дрожжевой двугибридной системе, а CRT1 *Zea mays* связывается с ТБ при анализе белковых взаимодействий на мембране. Также было показано, что в трансгенных растениях *N. benthamiana*, экспрессирующих *ZmCRT1*, был затруднен как ближний, так и системный транспорт BTM. Было сделано предположение, что CRT предотвращает транспорт ТБ к ПД, поскольку в этих трансгенных растениях ТБ распределялся в основном вдоль микротрубочек (Chen et al., 2005). Таким образом, было показано, что *ZmCRT1* играет противовирусную роль, ингибируя межклеточный транспорт BTM, и его можно рассматривать как противовирусный клеточный фактор.

Киназы

Вирусные транспортные белки функционально можно определить как не клеточные автономные белки (NCAP, non-cell-autonomous protein), т. е. белки, которые синтезируются в одной клетке и функционируют в другой (Citovsky, 1999; Waigmann et al., 2004; Sheshukova et al., 2020). Среди клеточных NCAP есть факторы транскрипции и другие регуляторные белки (Han et al., 2014). Растительная клетка содержит специфические протеинкиназы, которые участвуют в контроле межклеточного транспорта как эндогенных, так и вирусных NCAP (Lucas and Lee, 2004; Waigmann et al., 2004). Известно, что ТБ ВТМ подвергается фосфорилированию по нескольким остаткам Ser/Thr в С-концевой области (Citovsky et al., 1993; Waigmann et al., 2000; Karger et al., 2003). Было показано, что ТБ может фосфорилироваться киназой(ами), содержащимися во фракции, обогащенной белками клеточных стенок, по аминокислотным остаткам Ser258, Thr261 и Ser265 (Citovsky et al., 1993). Позднее было обнаружено, что ТБ содержит еще один сайт Thr104, который фосфорилируется киназами, ассоциированными с ЭР (Karger et al., 2003). Одна из киназ клеточной стенки – протеинкиназа, ассоциированная с плазмодесмами (PAPK, plasmodesmata-associated protein kinase), была выделена из обогащенной плазмодесмами фракции белков клеточной стенки суспензионной культуры табака. Была продемонстрирована колокализация ТБ ВТМ и PAPK *in vivo* (Lee et al., 2005). Более того, показано, что PAPK фосфорилирует не только ТБ ВТМ, но и некоторые клеточные NCAP *in vitro* (Lee et al., 2005).

Фосфорилирование ТБ ВТМ играет двойную роль (Lee and Lucas, 2001). Во-первых, фосфорилирование ТБ может контролировать дополнительные события в жизненном цикле вируса, такие как трансляция/репликация вирусной РНК. Показано, что РНК ВТМ в комплексе с ТБ ни транслируется, ни реплицируется *in vitro* пока ТБ не фосфорилирован киназами фракции клеточных стенок *N. tabacum*, а также в изолированных протопластах (Kargova et al., 1999). Во-вторых, фосфорилирование ТБ влияет на его способность обеспечивать межклеточный транспорт и перемещаться в соседние клетки (Waigmann et al., 2000; Trutnyeva et al., 2005).

Была продемонстрирована важная роль фосфорилирования в регуляции транспорта ТБ ВТМ (Waigmann et al., 2000). Показано, что мутантные формы ВТМ, содержащие аминокислотные замены (Ser258, Thr261 и Ser265 были заменены отрицательно заряженными аминокислотами), имитирующие фосфорилирование специфических остатков Ser/Thr в С-концевой части ТБ, не способны инфицировать *N. tabacum*, а также

перемещаться из клетки в клетку. Аналогичный эффект был продемонстрирован для ВТМ, содержащего Asp вместо Thr104 в ТБ. Примечательно, что замена Thr104 на нейтральный Ala не повлияла на инфекционность ВТМ (Karger et al., 2003). Однако, фосфорилирование ТБ оказалось видоспецифичной формой регуляции, и для других представителей рода *Nicotiana* – *N. clevelandii*, *N. benthamiana*, *N. glutinosa* – влияние фосфорилирования ТБ на развитие инфекции было иным (Waigmann et al., 2000; Trutnyeva et al., 2005). Было показано, что селективная имитация фосфорилирования по одному аминокислотному остатку усиливает межклеточный транспорт ТБ, тогда как имитация фосфорилирования по двум или трем остаткам приводит к подавлению транспорта. С-терминальное фосфорилирование не требуется для межклеточного перемещения ТБ ВТМ в *N. tabacum*, *N. benthamiana* и *N. clevelandii*. Напротив, в *N. glutinosa* фосфорилирование ТБ необходимо для эффективного транспорта. Было показано, что мутантная форма ТБ с аминокислотными заменами, имитирующими сайты фосфорилирования, выполняет транспортную функцию в *N. benthamiana*, *N. clevelandii* и *N. glutinosa*, но теряет эту функцию в *N. tabacum*, что указывает на негативное влияние фосфорилирования ТБ в этом хозяине на способность ТБ перемещаться между клетками (Waigmann et al., 2000; Trutnyeva et al., 2005). Также было показано, что транспортная функция ТБ, определяемая фосфорилированием, связана с внутриклеточным паттерном локализации, поэтому предполагается, что фосфорилирование влияет как на межклеточный транспорт ТБ, так и на его таргетинг в ПД (Trutnyeva et al., 2005). Таким образом, карбокситерминальное фосфорилирование ТБ ВТМ при инфицировании *N. tabacum*, с одной стороны, служит средством предотвращения тяжелых негативных эффектов для растения и, с другой стороны, позволяет вирусу «переключиться» с функции ближнего транспорта на ранних стадиях на репликацию на более поздних стадиях инфекции. Однако этот механизм, вероятно, функционирует только в *N. tabacum*, поскольку фосфорилированный ТБ способен к ближнему транспорту в *N. glutinosa*. Таким образом, даже для близкородственных видов растений можно обнаружить различные пути адаптации хозяина и вируса, поскольку механизм инактивации транспортной функции ТБ, опосредованный фосфорилированием, по-видимому, ограничен *N. tabacum*, но не распространяется на другие протестированные виды растений рода *Nicotiana*.

Пектинметилэстеразы

Пектинметилэстеразы (ПМЭ) – ферменты клеточной стенки, которые играют важную роль в ремоделировании клеточной стенки во время роста и развития растения (Micheli, 2001). ПМЭ удаляют метильную группу пектина, приводя к образованию

метанола (Lionetti et al., 2012), который действует как сигнальная молекула во время атак патогенов (Dorokhov et al., 2018). Было продемонстрировано, что ПМЭ *N. tabacum* взаимодействует с ТБ ВТМ и TVCV *in vitro* (Dorokhov et al., 1999; Chen et al., 2000), а ПМЭ *A. thaliana* связывается с ТБ TVCV (Lionetti et al., 2014). Взаимодействие ТБ ВТМ с ПМЭ томата было продемонстрировано в дрожжевой двугибридной системе (Chen et al., 2000). Более того было показано, что суперэкспрессия ингибитора ПМЭ (PMEI), снижая уровень накопления ПМЭ, существенно замедляет развитие инфекции ВТМ по сравнению с диким типом, опосредованно указывая на провирусную роль ПМЭ в развитии инфекции. Аналогичные результаты были получены на трансгенном арабидопсисе, содержащем дополнительную копию *PMEI* (AtPMEI-2): в этих линиях растений развитие инфекции TVCV также было замедлено. (Lionetti et al., 2014). Однако, несмотря на то, что даже был обнаружен домен ТБ, ответственный за связывание с ПМЭ, (Chen et al., 2000), открытым остается вопрос, где именно происходит взаимодействие этих двух белков и каков механизм, при помощи которого ПМЭ способствует развитию тобамовирусной инфекции (Lionetti et al., 2014).

Non-cell-autonomous pathway protein (aldose 1-epimerase-like protein)

ТБ ВТМ способен перемещаться из клетки в клетку независимо от вирусной РНК во время инфекции и, вероятно, выполняет функцию «кондиционирования» неинфицированных клеток, прилегающих к первично инфицированной, создавая благоприятную среду для распространения вируса перед инфекцией (Sheshukova et al., 2020). Благодаря такому свойству ТБ ВТМ можно рассматривать как неклеточный автономный белок NCAP, который функционирует за пределами клетки, в которой он был синтезирован. В целом, механизм межклеточного транспорта белков NCAP недостаточно изучен. Однако, в *N. tabacum* был обнаружен предполагаемый рецептор, связывающий ТБ для переноса его в смежные клетки – non-cell-autonomous pathway protein (NtNCAPP), который необходим для эффективного межклеточного транспорта ТБ ВТМ (Lee et al., 2003). Взаимодействие ТБ ВТМ с NCAPP *N. benthamiana* (также обозначаемым NbAELP, aldose 1-epimerase-like protein) продемонстрировано в анализе *in vitro* (Sheshukova et al., 2017b). Сообщалось, что NbNCAPP/AELP участвует в защитных реакциях растений, индуцируемых газообразным метанолом, а его экспрессия активируется в ответ на газообразный метанол. Суперэкспрессия NbNCAPP/AELP стимулировала репродукцию TMV:GFP и межклеточный транспорт макромолекул (Dorokhov et al., 2012). Однако снижение экспрессии *NbNCAPP/AELP* в стабильно трансформированных растениях *N. benthamiana* также способствовало развитию инфекции ВТМ по сравнению с растениями

дикого типа. Кроме того, была выявлена негативная корреляция между уровнями экспрессии *NbNCAPP/AELP* и ПМЭ. Таким образом, была предложена следующая модель: (1) в результате повреждения происходит активация ферментативной активности ПМЭ и экспрессии соответствующего гена приводит к выделению метанола, (2) происходит индукция экспрессии *NbNCAPP/AELP*, (3) за счет общего эффекта метанола и, в частности, в результате взаимодействия *NbNCAPP/AELP* с ТБ, происходит активация межклеточного транспорта вируса, (4) *NbNCAPP/AELP* подавляет экспрессию ПМЭ, вероятно, через воздействие на его промотор, а также конкурирует с ПМЭ за секрецию и созревание, (5) клетка возвращается к изначальному состоянию, характеризующемуся базовым уровнем экспрессии ПМЭ и *NbNCAPP/AELP* (Sheshukova et al., 2017b). Принимая во внимание, что и ПМЭ, и *NbNCAPP/AELP* являются белками, взаимодействующими с ТБ и способствующими межклеточному транспорту ВТМ, можно предположить, что они действуют на разных стадиях внутри- и межклеточного транспорта ТБ. С другой стороны, каждый из них может быть необходим для вирусной инфекции в определенный момент времени.

Обратимо гликозилируемые полипептиды

Обратимо гликозилированные полипептиды (RGP, Reversibly glycosylated polypeptides) участвуют в метаболизме клеточной стенки во время роста и развития растений, поскольку большинство этих белков, относящихся к классу 1, обладают мутазной активностью, способной катализировать преобразование UDP-арапиранозы в UDP-арабинофуранозу (Saqib et al., 2019). В дополнение к этой важной функции было показано, что RGP участвуют в ответе на вирусную инфекцию (Selth et al., 2006; Zavaliev et al., 2010; Burch-Smith et al., 2012; Kamarova et al., 2023). Более того, сообщалось, что *RGP N. benthamiana (NbRGP)* индуцируются в ответ на вирусную инфекцию. Было показано, что *NbRGP1* взаимодействует с ТБ ВТМ *in vitro* и *in vivo* (Kamarova et al., 2023). Временная сверхэкспрессия любого из *NbRGP1-3* приводит к снижению локального распространения и репликации ВТМ (Kamarova et al., 2023), тогда как их подавление посредством VIGS, напротив, приводит к более эффективному межклеточному транспорту ТБ:GFP и системному транспорту вирусного вектора TMV:GFP (Burch-Smith et al., 2012). Как временная, так и стабильная повышенная экспрессия *RGP* коррелирует с повышенным накоплением каллозы в области ПД. На основании этого можно предположить, что RGP влияют на распространение вируса и проницаемость ПД по каллоза-зависимому механизму (Sagi et al., 2005; Zavaliev et al., 2010; Kamarova et al., 2023). Но, принимая во внимание взаимодействие ТБ с RGP, можно предположить, что

ограничение ближнего транспорта вируса связано с прямым влиянием RGP на функционирование ТБ. Что касается локализации RGP и вопроса относительно «точки соприкосновения» RGP с ТБ ВТМ в клетке, то показана ассоциация RGP с мембранами аппарата Гольджи (Dhugga et al., 1997; Rautengarten et al., 2017; Kamarova et al., 2023), однако нельзя исключать, что при вирусной инфекции RGP могут направляться в ПД, где они, вероятно, могут создавать физический или функциональный барьер для вирусного межклеточного транспорта (Sagi et al., 2005; Kamarova et al., 2023).

Роль хлоропластов в регуляции межклеточного транспорта

Растения постоянно подвергаются воздействию стрессовых факторов окружающей среды и реагируют на них, модулируя экспрессию целого оркестра многочисленных генов, тем самым адаптируясь к внешним стимулам. Скоординированный и генерализованный ответ растений на неблагоприятные факторы не может обойтись без межклеточной коммуникации посредством ПД (Zanini and Burch-Smith, 2024). Межклеточный транспорт является очень важным процессом со сложной и многоуровневой регуляцией. Наряду с факторами, локализованными в ПД, которые участвуют в структурных и функциональных изменениях в ответ на различные стимулы, появляется все больше доказательств в пользу того, что пропускная способность ПД контролируется сигналами от других органелл, в первую очередь от хлоропластов и митохондрий (Lellis et al., 2002; Burch-Smith et al., 2011; Azim and Burch-Smith, 2020; Ganusova et al., 2020). Скоординированное функционирование клеточных компартментов, точная и своевременная передача сигнальных молекул и изменения в паттерне экспрессии генов как на транскрипционном, так и на трансляционном уровнях являются необходимыми для развития, роста и защитных реакций всего растения.

Более миллиарда лет назад произошли два независимых эндосимбиотических события, которые привели к появлению эукариотической клетки с митохондриями и способностью к фотосинтезу (Archibald, 2015; Azim and Burch-Smith, 2020; Zhang et al., 2023). Хлоропласты современных зеленых растений содержат около 3000 белков, более 95% из которых кодируются ядерным геномом (Brunkard and Burch-Smith, 2018). Хлоропласты – это органеллы, которые преобразуют световую энергию и производят фотоассимиляты. Но они также являются местом проведения многих метаболических процессов и играют важную роль в развитии, росте и защитных реакциях растений (Inaba and Ito-Inaba, 2010). Нарушение работы фотосинтетического аппарата приводит к изменению уровней АФК и окислительно-восстановительного статуса клеток, что, в свою

очередь, влияет на характер экспрессии ядерных генов, связанных с фотосинтезом (PhANG, Photosynthesis-Associated Nuclear Genes) (Bilgin et al., 2010; Brunkard and Burch-Smith, 2018; Crawford et al., 2018).

Хлоропласты представляют собой весьма динамичные органеллы, которые осуществляют фотосинтез и играют активную роль в противовирусной защите, являясь источником и местом синтеза различных метаболитов, фитогормонов, в т.ч. СК и ЖК, а также АФК (Bilgin et al., 2010; Souza et al., 2019; Alazem and Burch-Smith, 2024). Метаболиты, синтезированные в хлоропластах, участвуют в пути передачи сигналов от пластид в ядро, тем самым регулируя экспрессию различных генов и определяя физиологическое состояние клетки. Подобная регуляторная сеть получила название ретроградная сигнальная система хлоропластов (CRS, Chloroplast Retrograde Signaling) (Burch-Smith and Zambryski, 2012). В настоящее время сигналы CRS классифицируются на следующие группы: биогенные сигналы - те, которые генерируются хлоропластами во время их биогенеза; операционные сигналы – вырабатываются зрелыми хлоропластами в ответ на изменения окружающей среды, эти сигналы регулируют метаболизм и направлены на адаптацию к стрессу; сигналы деградации – это стресс-индуцированные сигналы от поврежденных или некорректно функционирующих хлоропластов, они направлены на деградацию самого хлоропласта (Crawford et al., 2018; Azim and Burch-Smith, 2020; Pfannschmidt et al., 2020). Модулируя экспрессию ядерных генов, CRS регулирует не только физиологическое состояние всей клетки, но и влияет на межклеточную коммуникацию. Обнаружение взаимосвязи между хлоропластной РНК-хеликазой ISE2, которая участвует в процессинге и трансляции хлоропластной РНК, и регуляцией проницаемости ПД стало отправной точкой для исследования взаимодействия хлоропластов и ПД. Исследования зародышей *ise2* мутантов арабидопсиса на стадии средней торпеды выявили участие хлоропластов в регуляции межклеточного транспорта и биогенеза ПД (Kobayashi et al., 2007; Burch-Smith et al., 2011; Bobik et al., 2017). Эти мутанты характеризуются более активным межклеточным транспортом 10-кДа флуоресцентно меченого декстрана и содержат как простые, так и разветвленные ПД, в то время как зародыши дикого типа на этой стадии развития содержат только простые ПД и не поддерживают межклеточное распределение декстрана (Kim et al., 2002; Kobayashi et al., 2007). Анализ экспрессии генов зародышей арабидопсиса линии *ise2* выявил изменения в экспрессии ядерных генов, кодирующих пластидные белки, участвующие в синтезе тетрапирролов, цикле Кальвина-Бенсона и компонентах электрон-транспортной цепи фотосинтетического аппарата хлоропластов, а также генов, вовлеченных в биогенез

и модификацию клеточной стенки (Burch-Smith et al., 2011). Подавление экспрессии гена *ISE2* в зрелых листьях *N. benthamiana* привело к тяжелому хлорозу, активации межклеточного транспорта и образованию вторичных ПД (Burch-Smith and Zambryski, 2010; Burch-Smith et al., 2011). Взаимосвязь между функционированием органелл, направляющих ретроградные сигналы в ядро, изменением экспрессии ядерных генов и, как результат, регуляцией биогенеза и функции ПД лежит в основе гипотезы ONPS (organelle-nucleus-PD signaling). Смысл гипотезы ONPS состоит в том, что хлоропласты, отвечающие за синтез фотоассимилятов, являются ключевыми регуляторами жизненных процессов и реакций на стрессовые воздействия (Burch-Smith et al., 2011; Azim and Burch-Smith, 2020).

Хлоропласты являются мишенью для многих вирусов, которые приспособились мастерски эксплуатировать хозяйскую растительную клетку, используя ее ресурсы на оптимальном для выживания обеих сторон уровне. Симптомы вирусной инфекции часто связаны с хлорозом, изменением пигментации или мозаичностью инфицированных листьев и являются следствием структурных и функциональных изменений хлоропластов, вызванных вирусными белками (Reinero and Beachy, 1989; Qiao et al., 2009; Bhat et al., 2013; Li et al., 2016; Bhattacharyya and Chakraborty, 2018; Budziszewska and Obrępalska-Stęplowska, 2018). Многие вирусы растений кодируют белки, направляемые после синтеза в хлоропласты, и зачастую используют клеточные белки для доставки в хлоропласт вирусных факторов (Qiao et al., 2009; Bhattacharyya and Chakraborty, 2018). Вирусная инфекция приводит к подавлению фотосинтетических функций хлоропластов и защитных реакций, в том числе сигнальные пути ЖК и СК (Reinero and Beachy, 1989; Bilgin et al., 2010; Souza et al., 2019). Хлоропласты имеют двойную мембрану, отделяющую их содержимое от внутренней среды клетки, и потенциально могут являться прекрасным местом для репликации вирусного генома, поскольку внутри хлоропласта вирус оказывается практически изолирован от РНКи и действия защитных ответов клетки, функционирующих в цитоплазме (Tabler and Tsagris, 2004; Laliberté and Sanfaçon, 2010; Bhattacharyya and Chakraborty, 2018). Для многих вирусов характерно структурное преобразование внутренней среды клетки и мембранных внутриклеточных компартментов. Мембранные структуры, формирование которых индуцировано вирусом, могут образовываться на основе мембран различных клеточных компартментов, включая ядро, ЭР, пероксисомы, митохондрии и хлоропласты, и используются вирусом для сборки VRC и/или транспорта (Laliberté and Sanfaçon, 2010). Используя различные стратегии, вирусные белки внедряются в эти компартменты, что позволяет им брать под свой

контроль работу органелл, влиять на экспрессию ядерных генов, подавлять антивирусные иммунные ответы и, таким образом, создавать благоприятные условия для размножения и распространения (Bhattacharyya and Chakraborty, 2018).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Условия выращивания растений

Растения *Nicotiana benthamiana* дикого типа были выращены в грунте при контролируемых световых и температурных условиях: 16 часов на свету при температуре 24 градуса и 8 часов в темноте при 18 градусах.

Генноинженерные конструкции, используемые в работе

Для индукции сайленсинга гена *NbKPILP* на фоне развивающейся инфекции ХВК, была использована генноинженерная конструкция, созданная на основе генома ХВК: фрагмент гена *NbKPILP* длиной 183 нт (с 70 по 253 нт кодирующего участка) был амплифицирован с использованием пары праймеров F1/R1 (таб. 1). Продукт ПЦР был обработан эндонуклеазами рестрикции NruI-SalI, затем лигирован в вектор pPVX201 под контроль дублированного промотора гена белка оболочки (Charman et al., 1992). Для получения финальной конструкции pPVX:frKPILP полученный субклон был обработан рестриктазами AvrII-SalI, а целевой фрагмент лигирован в вектор PVX-BIN19 (Komarova et al., 2006).

При получении конструкции 35S-siKPILP использовали плазмиду pKANNIBAL, содержащую растительный интрон пируват ортофосфат дикиназы (PDK) *Flaveria trinervia*, промотор 35S вируса мозаики цветной капусты, терминатор гена октопин синтазы OCS, полилинкеры сайтов узнавания рестриктаз (Wesley et al., 2001) в качестве основы для создания экспрессионной кассеты. Фрагмент гена *NbKPILP* длиной 346 нт (с 258 по 603 нт кодирующего участка) был амплифицирован при использовании соответствующих пар праймеров (таб. 1): фрагмент в смысловой ориентации получен при использовании пары F2/R2 и фланкирован сайтами узнавания рестриктаз XhoI-EcoRI, фрагмент в антисмысловой ориентации получен при использовании пары F3/R3 и фланкирован сайтами BamHI-XbaI. Продукты ПЦР были обработаны соответствующими рестриктазами. Интрон PDK был получен в результате обработки рестриктазами EcoRI-BamHI плазмиды pKANNIBAL. Затем оба продукта ПЦР и интрон были лигированы в плазмиду pKANNIBAL, обработанную рестриктазами XhoI-XbaI. Для получения финальной конструкции 35S-siKPILP экспрессионная кассета, содержащая 35S-промотор, фрагмент в смысловой ориентации, интрон, фрагмент в антисмысловой ориентации и

терминатор OCS, была получена после обработки эндонуклеазой рестрикции PvuII полученного вектора pKANNIBAL, а фрагмент этой реакции лигирован в вектор pCambia1300, обработанный той же рестриктазой.

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в клонировании.

Название праймера	Последовательность
F1	TCGCGAACCAGTTCTTGATAC
R1	GTTCGACATTAAGAATTTTAAAGGAAG
F2	CTCGAGTTCAAGTGCAGGGCTAGTAATTGACG
R2	GAATTC AACCTTCTTGAACACAATCTTGAAA ACTGG
F3	GGATCC AACCTTCTTGAACACAATCTTGAAA ACTGG
R3	TCTAGATTCAAGTGCAGGGCTAGTAATTGACG

Измерение уровня глюкозы в листьях

Анализируемый материал был высушен при 50°C в течение 24 часов. Высушенные образцы (точная навеска 30 мг) гидролизованы в 1 мл 1М соляной кислоты при 100°C в течение 2,5 часов. Полученный раствор центрифугировали 10 мин при 14000xg. К 0,5 мл суператанта добавлено 1,5 мл воды mQ, результирующий раствор пропущен через обращенно-фазный концентрирующий патрон (Диасорб С16). Первые 1,8 мл были удалены, оставшиеся 0,2 мл собраны. Раствор глюкозамина в концентрации 1 г/л был использован в качестве внутреннего стандарта для каждого образца. Раствор глюкозы в концентрации 1 г/л был использован в качестве внешнего стандарта. К исследуемым образцам добавлено по 20 мкл внешнего и внутреннего стандартов и упарено на вакуумном центрифужном испарителе типа SpeedVac с подогревом в полипропиленовой пробирке. К высушенной пробе добавили 20 мкл 0,5М раствора РМР (1-фенил-3-метил-5-пиразолон) в метаноле и 20 мкл 0,3М КОН, затем тщательно перемешали и упарили при 70°C в течение 2 часов. Нейтрализация проб произведена 20 мкл 0,3М соляной кислоты, затем дважды произведена экстракция избытка РМР 500 мкл бензола. Остаток упарен на SpeedVac с подогревом и растворен в 500 мкл смеси ацетонитрил/вода (1:9). Тестовую смесь и образцы анализировали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиентном режиме на колонке Luna C18 (2) 4,6x250 мм (5 мкм) с подвижной фазой А – вода, Б – ацетонитрил и Д – 100 мМ водного раствора гидрофосфата калия (рН 9,12) при скорости потока 1 мл/мин, температуре 25°C и детекции при длине волны 260 нм с использованием градиентного хроматографа Agilent 1100 с детектором с фотодиодной матрицей. Сбор и обработку хроматограмм проводили с помощью программ ChemStation (Agilent) и AutoChrom1200 (ACDlabs).

Количественная ПЦР в реальном времени (ОТ-кПЦР)

Суммарная РНК была выделена из листьев с использованием TriReagent (MRC, США) в соответствии с протоколом производителя. Концентрации РНК определяли на спектрофотометре Nanodrop ND-1000 (Isogen Life Sciences, Нидерланды). Все образцы РНК имели коэффициент абсорбции 260:280 в интервале 1.9-2.1. Синтез первой цепи был выполнен следующим образом: 0.1 мг случайных гексамерных праймеров и 0.1 мг праймеров oligo-dT добавляли к 2 мг тотальной РНК, чтобы получить кДНК с помощью обратной транскрипции, используя обратную транскриптазу Superscript IV reverse transcriptase (Invitrogen, США), в соответствии с протоколом производителя. Количественная ПЦР в режиме реального времени выполнена на приборе iCycler iQ real-time PCR detection system (Bio-Rad, США). В качестве референсных использовали гены 18S рРНК и *PP2A* (protein phosphatase 2A). Целевые гены детектировали, используя специфические праймеры из таблицы 2 и Eva Green master mix (Синтол, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Для каждого образца было сделано 3 технических повтора и поставлена контрольная реакция без добавления матрицы. В каждом эксперименте было выполнено минимум 5 биологических повторов. Результаты оценивали, используя алгоритм Pfaffl (Pfaffl, 2001).

Таблица 2. Олигонуклеотиды, использованные в ОТ-кПЦР.

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Номер
<i>18S rRNA</i>	ACGGCTACCACATCCAAG	ACTCATTCCTCAATTACCAGACTC	KP824745.1*
<i>PP2A</i>	ATTGCTGCCTGTGGTTATTAC	ATAGACTGAAAGTGCTTGATTGG	MF996339.1*
<i>NbKPILP</i>	TGAGCACTGGCGGAATTAAGG	ATACCAATATACCCACACAACAATCTG	FN687760.1*
<i>NbKPILP</i> ^Δ	TCCGTCCAGGTTACACCTACT	CTTGAAAAACGTCGAGCGGG	
<i>Pol PVX</i>	CTAGGTCTACCCAAGATTA	GTGGTCTCACAGTTTATG	MF405302.1*
<i>GLK</i>	GTCTCACTCGCCATAACATAGC	TTTCCGCCACCTCCAACC	Niben101Scf06721g00011.1 [#]
<i>LHCB1</i>	TGTCGCCAAACCCGTCGCATCT	TTCACCGGTCAAGTAACTTGGG	Niben101Scf03455g01031.1 [#]
<i>LHCB2</i>	TGCGACGTACGGTTAGAAGT	CTCGGAGAATGGTCCCAAGT	Niben101Scf01987g00015.1 [#]
<i>RBCS1A</i>	GCTGCCTCATTCCCTGTTC	CCTGCATGCATTGCACTCTT	Niben101Scf03015g06015.1 [#]
<i>HEMA1</i>	ATGTGGGTGCTTGTGTGAAC	AGGCGGTCCTCCTTATTAGC	Niben101Scf03068g00024.1 [#]
<i>XTH5</i>	ATCTTTGTGGATGACGTCCC	CATCTGCATCCCAAAGGCTC	Niben101Scf00369g05011.1 [#]
<i>MP TMV</i>	GGTGTGAGCGTGTGTCTGG	GCGTCTGGGTGGTTATAGC	
<i>MP crTMV</i>	CGCAGCCAAGAGTAAGAG	GTGACCATAGCAACTGAAAC	
<i>GFP</i>	GCAGAAGAACGGCATCAAG	GCTCAGGTAGTGGTTGTGCG	

(*) База данных GeneBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>

([#]) База данных SolGenomics <https://solgenomics.net>

(^Δ) Пара праймеров использована для детекции индукции сайленсинга *NbKPILP* шпилечной структурой siKPILP

Агробактериальная трансформация

Agrobacterium tumefaciens штамм GV3101 трансформировали индивидуальными бинарными векторами и выращивали в жидкой питательной среде LB с добавлением антибиотиков 50 мг/л рифампицина, 25 мг/л гентамицина и 50 мг/л канамицина. Ночную культуру агробактерии разводили в буфере, содержащем 10 мМ MES (pH 5.5) и 10 мМ MgSO₄. Ночную культуру бактерий, содержащих вирусные векторы pPVX, pPVX(frKPILP) и с инфекционной копией крВТМ, разводили до OD₆₀₀~0.01 о.е. Ночную культуру бактерий, содержащих векторы TMV:GFP или crTMV:GFP, разводили до OD₆₀₀~0.3 о.е. для инфильтрации растений, зараженных ХВК, и до OD₆₀₀~0.01 о.е. для инфильтрации интактных растений. Ночную культуру бактерий, содержащих плазмиду pCambia1300 или 35S-hpKPILP, разводили до OD₆₀₀~0.1 о.е. Бактериальную суспензию вводили в листья при помощи 2-мл шприца без иглы, после чего растения находились в стандартных условиях.

Заражение растений при системной инфекции

Для получения системной инфекции ХВК нижние листья молодых растений *N. benthamiana* в возрасте 4-5 недели инфильтрировали суспензией агробактерий. Спустя 10-14 дней вирусная инфекция достигала верхних листьев. Для заражения ВТМ использовали суспензию, содержащую вирусные частицы в концентрации 300 мкг/мл в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, которую в объеме 30 мкл наносили на листья нижних ярусов при использовании абразива (целит). Для заражения крВТМ суспензию агробактерий, содержащих плазмиду, кодирующую инфекционную копию вируса, вводили в листья нижних ярусов. При тоск-инокуляции на нижние листья наносили 10 мМ натрий-фосфатный буфер и целит.

Окрашивание каллозы и количественная оценка

Для визуализации отложений каллозы вокруг плазмодесм листья *N. benthamiana* с повышенной и пониженной экспрессией *NbKPILP* на фоне инфекции ХВК, а также интактных растений были инфильтрированы раствором анилинового синего (0,1% анилиновый синий (Sigma Aldrich) в 0,01М K₃PO₄, pH 12). Затем листья инкубировали в темноте в течение 15 минут при комнатной температуре и визуализировали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Nikon C2. Возбуждение флуоресценции красителя проводили при длине волны 403 нм, а детекцию – при 447 нм. Количественная оценка отложений каллозы выполнена по алгоритму (Zavaliev and EpeI, 2015) при использовании программного обеспечения ImageJ.

Визуализация GFP в листьях и количественная оценка очагов инфекции

Очаги инфекции, образовавшиеся в листьях вследствие заражения вирусными векторами TMV:GFP и сrTMV:GFP были визуализированы при помощи портативной УФ-лампы при длине волны 366 нм. Площадь очагов и интенсивность флуоресценции GFP оценивали, используя программное обеспечение ImageJ (Schneider et al., 2012).

Анализ белковых экстрактов листьев, инфицированных ХБК, ВТМ и крВТМ

Общий растворимый белок из инфицированных вирусами листьев *N. benthamiana* был выделен гомогенизацией фрагментов листьев в буфере 1xPBS (1,7 мМ KH_2PO_4 , 5,2 мМ Na_2HPO_4 , 150 мМ NaCl) с последующим центрифугированием для осветления экстракта. Супернатант отбирали, добавляли 4x Sample buffer, содержащий β -меркаптоэтанол. Белковые препараты разделяли в 12% ПААГ на приборе Mini Protean (Biorad, США) с последующей окраской Кумасси бриллиантовым синим G-250.

Статистический анализ

Данные анализировали либо с помощью t-критерия Стьюдента, либо с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA, как указано в подписях к рисункам. Значимость различий между группами оценивали с помощью теста Tukey HSD при уровне $p < 0,05$ или с помощью t-критерия Стьюдента. На всех гистограммах представлены среднее значение и стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ уровня экспрессии *NbKPILP* в условиях системной инфекции X вируса картофеля и тобамовирусов, ВТМ и крВТМ

В интактных зрелых листьях *N. benthamiana* экспрессия *NbKPILP* подавлена за счет экспрессии вложенной альтернативной рамки считывания, которая находится в составе мРНК *NbKPILP*. Также показано, что при заражении листьев *N. benthamiana* вирусным вектором крВТМ:GFP, созданным на основе генома крВТМ и не способным к системному транспорту, экспрессия *NbKPILP* активируется. Активация экспрессии также показана для *NiKPILP* в растениях *N. tabacum* с системной инфекцией ВТМ, особенно в светло-зеленых зонах мозаичного листа с активной вирусной репродукцией (Sheshukova et al., 2017). Для того чтобы понять, является ли активация экспрессии *NbKPILP* частью генерализованного ответа на вирусную инфекцию, были получены растения *N. benthamiana* с системной инфекцией X вируса картофеля (ХВК), ВТМ и крВТМ. Для этого использовали вирусный вектор рPVX (Komarova et al., 2006), кодирующий инфекционную копию ХВК, вектор с инфекционной копией крВТМ или суспензию частиц ВТМ.

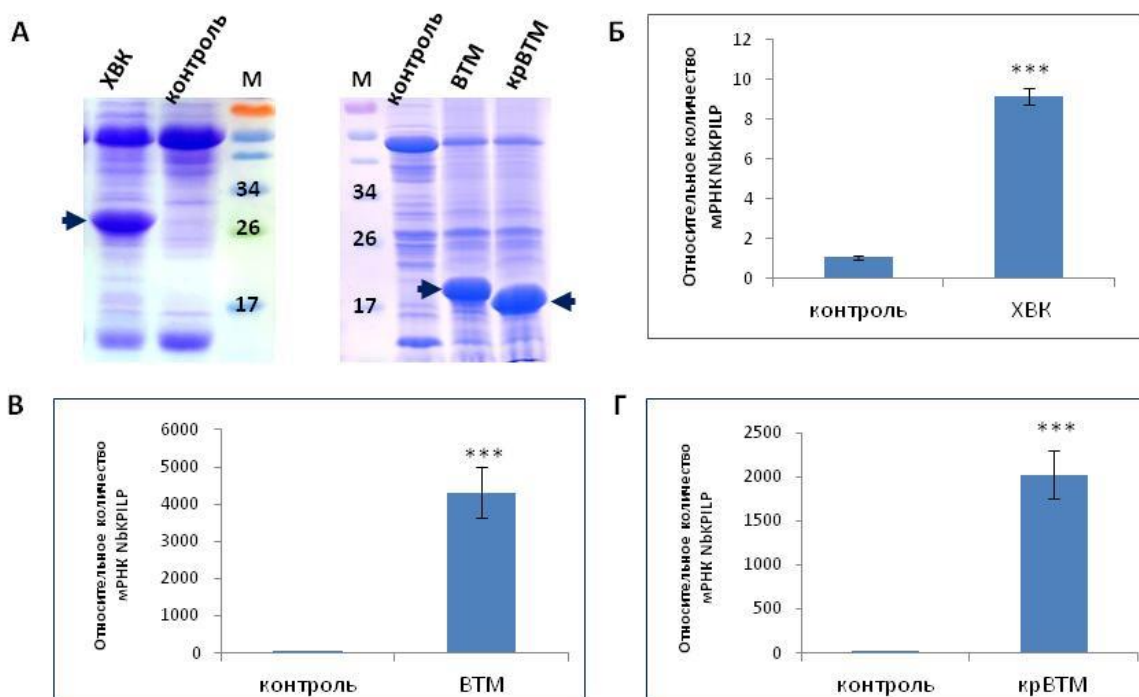


Рисунок 5. Экспрессия *NbKPILP* активируется при вирусной инфекции. А – экстракт растворимых белков из листьев, инфицированных ХВК (слева) и ВТМ и крВТМ (справа). Электрофорез в 12% ПААГ, гель окрашен Кумасси бриллиантовым синим G-250. Зоны, соответствующие белку оболочки вирусов, маркированы стрелками. М, маркеры

молекулярной массы (кДа). Б, В и Г – относительное количество мРНК *NbKPILP* в листьях с системной инфекцией ХВК (Б), ВТМ (В) и крВТМ (Г), оцененное с помощью ОТ-кПЦР. Здесь и далее представлены среднее значение и стандартная ошибка. Уровень накопления мРНК *NbKPILP* в интактном растении того же возраста был принят за 1. Нормировка на значения, полученные для мРНК гена протеин фосфатазы 2А (PP2A). ***, $p < 0,001$ (двухвыборочный t-критерий Стьюдента).

Развитие системной инфекции ХВК происходило на 7 день после агроинфилтрации, пробы для анализа собирали на 10-14 день после заражения. Тобамовирусная симптоматика проявлялась на 7 день после инокуляции, пробы собирали на 7-10 день. Помимо видимых симптомов, инфекцию подтверждали, собирая образцы для выделения общего растворимого белка, после чего препараты разделяли методом электрофореза в ПААГ с последующим окрашиванием Кумасси, что позволяло выявить мажорную полосу, соответствующую по массе белку оболочки вирусов (рис. 5А).

Из верхних листьев с подтвержденной инфекцией выделяли тотальную РНК, после чего анализировали уровень экспрессии *NbKPILP* методом количественной ПЦР в реальном времени, предваряемой обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР). Рисунок 5 Б, В и Г показывает, что экспрессия *NbKPILP* повышается в ответ на системную инфекцию ХВК в ~10 раз, ВТМ и крВТМ – более чем в 2000 раз.

Создание модельной системы для анализа функций *NbKPILP* при взаимодействии вирус-растение

Для того чтобы выяснить роль и функции *NbKPILP* в ответных реакциях растения на вирусную инфекцию, была создана модельная система, основанная на индукции РНК интерференции, приводящей к подавлению экспрессии целевого гена. В данном подходе использовали технику вирус-индуцируемого сайленсинга генов (VIGS). Подход с использованием техники VIGS приводит к уменьшению количества мРНК для эндогенных генов растений, которые имеют сходство с последовательностью, содержащейся в вирусном векторе (Burton et al., 2000; Shimizu et al., 2009). При этом достаточно доставить в клетку последовательность длиной несколько сотен нуклеотидов для формирования двуцепочечной (дц) РНК, которая будет образовываться при репликации вирусного вектора. Такая дцРНК будет индуцировать сайленсинг целевого гена. Таким образом, можно использовать не целый ген, а лишь часть последовательности. Для создания конструкции был выбран участок *NbKPILP* длиной 183 нт с 70 по 253 нуклеотид кодирующей области. Выбранный фрагмент *NbKPILP* клонирован в вектор pPVX

(Komarova et al., 2006) под дублированный промотор гена белка оболочки. В результате была получена конструкция рPVX:frKPILP (Рис. 6А).

Доставку конструкции осуществляли методом агротрансформации: в нижние листья молодых 4-5 недельных растений *N. benthamiana* вводили инфильтрацией суспензию агробактерий, несущих вирусный вектор рPVX:frKPILP для индукции сайленсинга. В нижних инфильтрированных листьях образовывались вирусные частицы, способные к дальнему транспорту. В результате распространения по растению они достигали верхних листьев и начинали там репродуцироваться, вызывая подавление экспрессии *NbKPILP*. В качестве контроля использовали вирусный вектор рPVX, кодирующий полную инфекционную копию ХВК, при заражении которым экспрессия *NbKPILP* активируется. Через ~7 дней на верхних листьях появлялись симптомы системной инфекции (рис. 6Б), а анализ накопления мРНК *NbKPILP* в обоих типах инфицированных растений проведен на 10-12 день после инокуляции (д.п.и.).

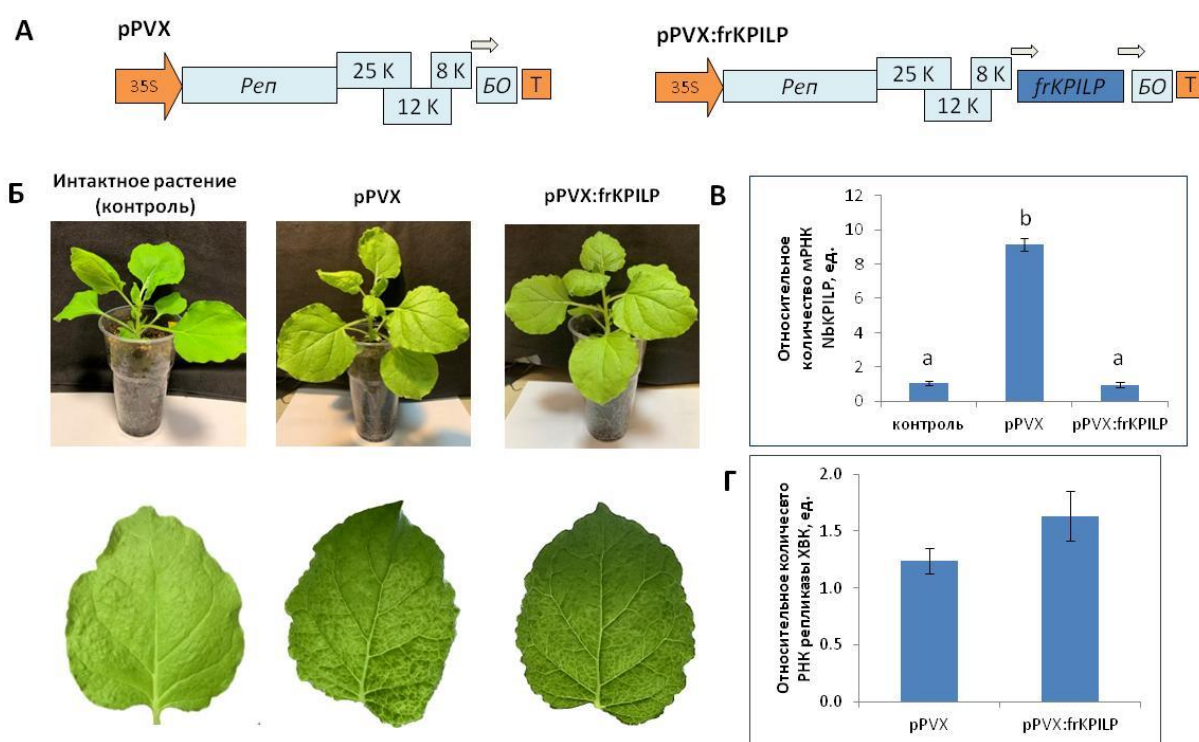


Рисунок 6. Модельная система для анализа функций *NbKPILP*. А – схематическое изображение векторов, созданных на основе генома ХВК, используемых для индукции (рPVX, слева) и подавления (рPVX:frKPILP, справа) экспрессии *NbKPILP*; 35S – 35S промотор вируса мозаики цветной капусты, Rep – ген репликазы ХВК, 25К, 12К и 8К – гены тройного блока ХВК, БО – ген белка оболочки ХВК, стрелка обозначает субгеномный промотор гена БО, frKPILP – фрагмент последовательности *NbKPILP*. Б – растения *N. benthamiana* модельной системы на 10 д.п.и, используемые в экспериментах. В – относительное количество мРНК *NbKPILP* в растениях модельной системы,

оцененное ОТ-кПЦР. Уровень накопления мРНК *NbKPILP* в интактном растении был принят за 1. Данные были проанализированы с использованием ANOVA. Разные буквы над столбцами указывают, что различия статистически значимы при $p < 0,05$ (HSD Tukey). Контроль – интактное контрольное растение, рPVX – с системной инфекцией ХВК, рPVX:frKPILP – с подавленной экспрессией *NbKPILP* на фоне системной инфекции ХВК. Г – относительное количество геномной РНК ХВК в растениях, инфицированных рPVX и рPVX:frKPILP, оцененное ОТ-кПЦР и праймерами к гену репликазы ХВК. Различия в экспрессии статистически не значимы (двухвыборочный t-критерий Стьюдента).

Техника VIGS позволила подавить экспрессию *NbKPILP* на фоне инфекции ХВК более чем на 87% (рис. 6В). Количественные показатели мРНК *NbKPILP* были сравнимы с интактными растениями того же возраста. Уровень репродукции вируса в растениях с системной инфекцией рPVX:frKPILP или рPVX существенно не отличался, что было продемонстрировано при оценке уровней геномной РНК ХВК (рис. 6Г). Таким образом, была создана модельная система, позволяющая сравнивать эффекты повышенной и подавленной экспрессии *NbKPILP* на фоне вирусной инфекции.

Исследование влияния повышенной экспрессии *NbKPILP* на физиологический статус растения *N. benthamiana* в условиях системной инфекции ХВК

***NbKPILP* участвует в регуляции передачи ретроградных сигналов от хлоропластов в ядро**

Ранее было показано, что уровень мРНК *NbKPILP* в корнях существенно выше, чем в фотосинтетически активных зрелых листьях. Кроме того, в инфицированном ВТМ листе табака с проявлением симптомов в виде мозаики в светло-зеленых зонах с измененной пигментацией и активной репродукцией вируса уровень мРНК *NbKPILP* существенно выше, чем в темно-зеленых зонах (Sheshukova et al., 2017). В совокупности эти наблюдения позволяют предположить, что активация *NbKPILP* на фоне инфекции приводит к разрушению хлорофилла и/или может быть направлена на подавление функции хлоропластов и фотосинтеза в целом. В хлоропластах осуществляются многие метаболические процессы, продукты которых определяют физиологический статус клетки, поскольку представляют собой компоненты путей передачи ретроградных сигналов от пластид к ядру. Для проверки предположения об участии *NbKPILP* в регуляции передачи ретроградных сигналов хлоропластов (CRS), была оценена экспрессия ядерных генов, ассоциированных с фотосинтезом, (photosynthesis-associated nuclear genes, PhANG), продукты которых в норме локализуются в хлоропластах и

обеспечивают их нормальное функционирование. *GOLDEN2-LIKE1 (GLK1)* кодирует транскрипционный фактор, необходимый для нормального развития хлоропластов (Fitter et al., 2002). Экспрессия *GLK1* коррелирует с экспрессией генов, ассоциированных с фотосинтезом, и подавляется при нарушении функционирования хлоропластов (Kakizaki et al., 2009). *LHCB1* и *2* кодируют антенные белки светособирающих комплексов фотосистем (Song et al., 2018); *RBCS1A* кодирует одну из изоформ малой субъединицы RUBISCO, которая участвует в противовирусном иммунном ответе растений (Bhat et al., 2013). Изменения экспрессии *LHCB1*, *2* и *RBCS1A* координируют ретроградные сигналы, которые определяют физиологический статус хлоропластов (Susek et al., 1993; Burch-Smith et al., 2011). *HEMA1* кодирует белок хлоропластов, глутамил-тРНК редуктазу, которая обеспечивает первую стадию биосинтеза тетрапиррола (метаболического пути, промежуточные продукты которого служат сигналами регуляции экспрессии ядерных генов) (Schmied et al., 2011; Song et al., 2018). Анализ экспрессии выше перечисленных генов осуществляли методом ОТ-кПЦР, оценивая, таким образом, уровни накопления соответствующих мРНК (рис. 7).

На рисунке 7А представлены результаты анализа образцов РНК, выделенной из листьев растений (i) с системной инфекцией ХВК и повышенной экспрессией *NbKPILP*, вызванной заражением рPVX, (ii) с системной инфекцией ХВК и подавленной экспрессией *NbKPILP*, вызванной заражением рPVX:frKPILP, (iii) и из контрольных, интактных растений того же возраста. По результатам анализа видно, что в зараженных рPVX растениях, где *NbKPILP* активирован, экспрессия анализируемых генов подавлена по сравнению с интактными растениями. В то время как в растениях, инфицированных рPVX:frKPILP, где *NbKPILP* подавлен, экспрессия *GLK1* подавлена, как и в растениях, зараженных рPVX, экспрессия *LHCB1* и *LHCB2* подавлена, но в меньшей степени, чем в растениях, зараженных рPVX, и эта разница статистически значима. Экспрессия генов *RBCS1A* и *HEMA1* в растениях с подавленным *NbKPILP*, остается на том же уровне, что и в интактных растениях.

Дополнительно была произведена проверка вышеперечисленных генов, ассоциированных с фотосинтезом, в условиях транзientной экспрессии *NbKPILP*. Для этого использовали генно-инженерную конструкцию *35S-NbKPILP*, содержащую последовательность *NbKPILP* под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты в составе бинарного вектора рCambia1300. Доставку генетического материала осуществляли в листья *N.benthamiana* методом агротрансформации, а пробы для анализа собирали на третий день после инфильтрации, выделяя из листьев тотальную РНК.

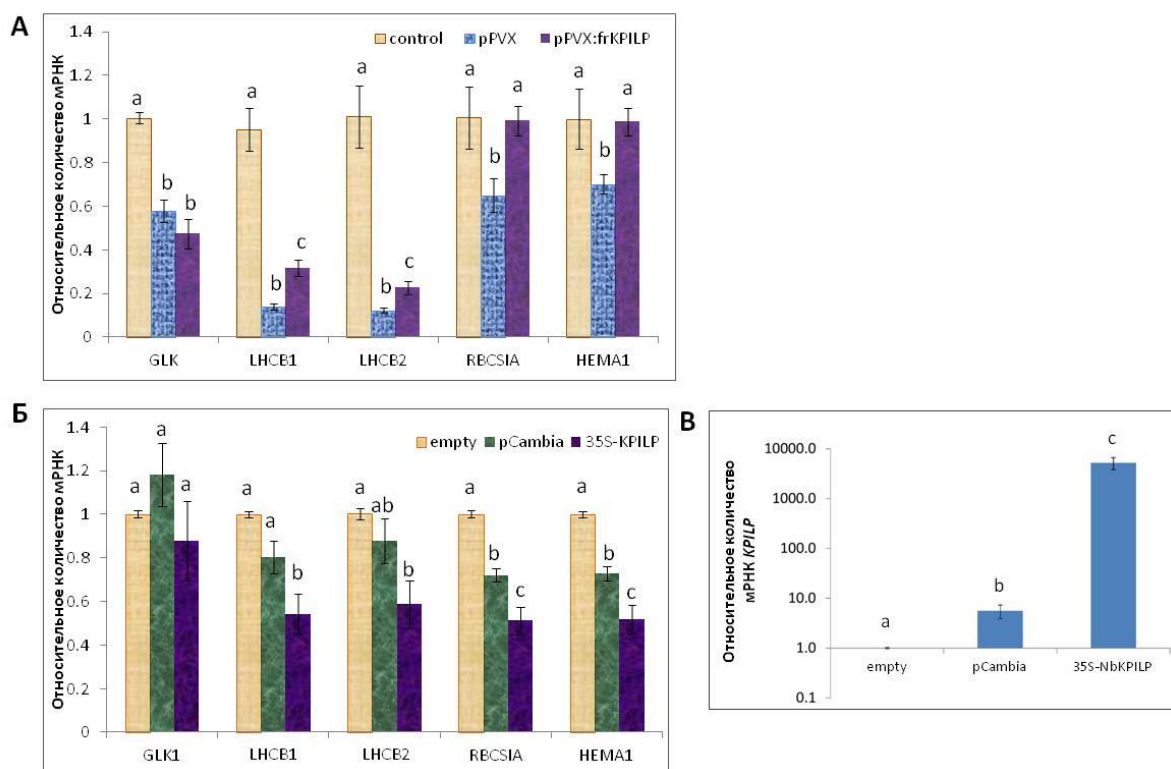


Рисунок 7. *NbKPILP* регулирует экспрессию генов, ответственных за передачу ретроградных сигналов хлоропластов. А – Относительное количество мРНК генов, ответственных за передачу ретроградных сигналов хлоропластов, при повышенной (pPVX) и подавленной (pPVX:frKPILP) экспрессии *NbKPILP*, оцененное с помощью ОТ-кПЦР. Уровень накопления мРНК каждого гена в контрольном растении (control) принят за 1. Данные проанализированы с использованием теста Краскела-Уоллиса. Столбцы с разными буквами указывают на статистически значимую разницу в соответствии с *post-hoc* тестом Данна при $p < 0,05$. Б и В – Относительное количество мРНК генов-маркеров запуска передачи ретроградных сигналов хлоропластов (Б) и мРНК *NbKPILP* (В) на 3 д.п.и. суспензией агробактерий, содержащих pCambia или 35S-*NbKPILP*, по результатам ОТ-кПЦР. Уровень накопления мРНК каждого гена в интактном листе (empty) принят за 1. Разные буквы над столбцами указывают, что различия статистически значимы при $p < 0,05$ (ANOVA, HSD Tukey).

Анализ ОТ-кПЦР показал, что в условиях транзientной экспрессии 35S-*NbKPILP* происходит подавление экспрессии *LHCB1*, *LHCB2*, *RBCS1A* и *HEMA1* по сравнению с интактными листьями, а экспрессия *GLK1* не меняется. Стоит отметить, что агроинfiltrация контрольным бинарным вектором pCambia1300, которая сама по себе индуцирует небольшое повышение уровня мРНК *NbKPILP* (рис. 7В), также приводит к колебаниям в экспрессии анализируемых генов, участвующих в ретроградном сигналинге (рис. 7Б): *RBCS1A* и *HEMA1* подавлены, но в меньшей степени, чем при экспрессии 35S-*NbKPILP*; разница в экспрессии *LHCB1*, *LHCB2* между интактными листьями и контрольными (pCambia1300) листьями статистически не значима; а экспрессия *GLK1* не

меняется. Таким образом, было показано, что как *NbKPILP* принимает участие в негативной регуляции экспрессии генов *LHCB1*, *LHCB2*, *RBCS1A* и *HEMA1* и, таким образом, участвует в регуляции передачи ретроградных сигналов от пластид в ядро.

***NbKPILP* участвует в регуляции углеродного метаболизма**

Фотоассимиляты являются продуктом фотосинтеза, и их физиологическое распределение по всему растению необходимо для правильного роста, созревания и размножения. Вирусная инфекция негативно влияет на фотосинтез и приводит к дисфункции хлоропластов и истощению ресурсов, поэтому была проведена оценка уровня накопления глюкозы в source-листьях и в sink-частях трех групп растений модельной системы: в интактных, в инфицированных pPVX и в инфицированных pPVX:frKPILP. Source-листья – это зрелые листья, которые производят основной объем фотоассимилятов, служащих запасом питательных веществ для всего растения. Sink-части растений – это акцепторные части, которые включали в себя верхушечные части растения с молодыми листьями длиной менее 1 см, цветки и цветочные почки. В source-листьях, инфицированных как pPVX, так и pPVX:frKPILP, наблюдалось снижение уровня глюкозы по сравнению с интактными растениями: в 6 и 2 раза, соответственно (рис. 8).

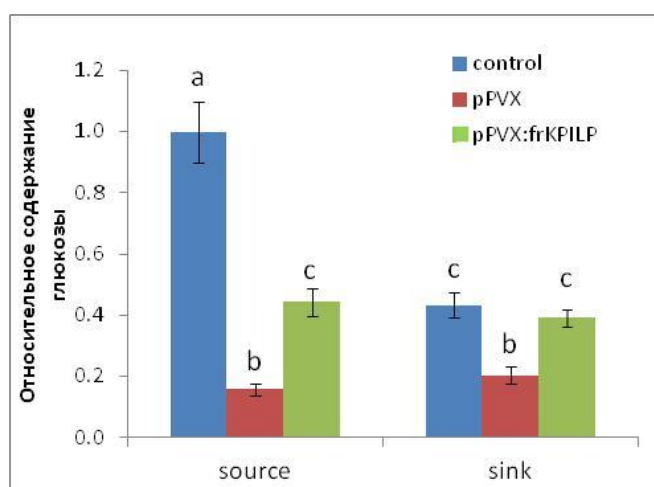


Рисунок 8. *NbKPILP* участвует в регуляции углеродного метаболизма. Относительное содержание глюкозы в source и sink тканях растений *N. benthamiana* с системной инфекцией pPVX или pPVX:frKPILP. Уровень глюкозы в исходных листьях контрольных растений (control) принят за 1. Разные буквы над столбцами указывают, что различия статистически значимы при $p < 0,05$ (ANOVA, HSD Tukey).

Это указывает на подавление фотосинтеза и углеродного метаболизма, вызванное вирусной инфекцией. Однако в sink-частях растений с подавленной экспрессией *NbKPILP* уровень глюкозы был таким же, как и в интактных растениях, а в инфицированных pPVX растениях, где экспрессия *NbKPILP* повышена, содержание глюкозы было в 2 раза ниже,

чем в интактных. Эти результаты указывают на то, что *NbKPILP* участвует в регуляции накопления и распределения фотоассимилятов во время инфекции ХВК, а снижение уровня глюкозы связано с активацией экспрессии *NbKPILP*, вызванной ХВК.

***NbKPILP* участвует в регуляции отложений каллозы вокруг плазмодесм**

В соответствии с гипотезой о том, что биогенез и функционирование ПД во много зависят от физиологического статуса пластид, которые посредством ретроградных сигналов регулируют межклеточный транспорт (Burch-Smith et al., 2011), было сделано предположение о том, что данная регуляция на фоне вирусной инфекции может происходить при участии *NbKPILP*. Одним из механизмов регуляции пропускной способности ПД является модуляция отложений каллозы вокруг канала. Увеличение отложения каллозы вызывает уменьшение апертуры ПД, а деградация каллозы приводит к расширению ПД и активации межклеточного транспорта.

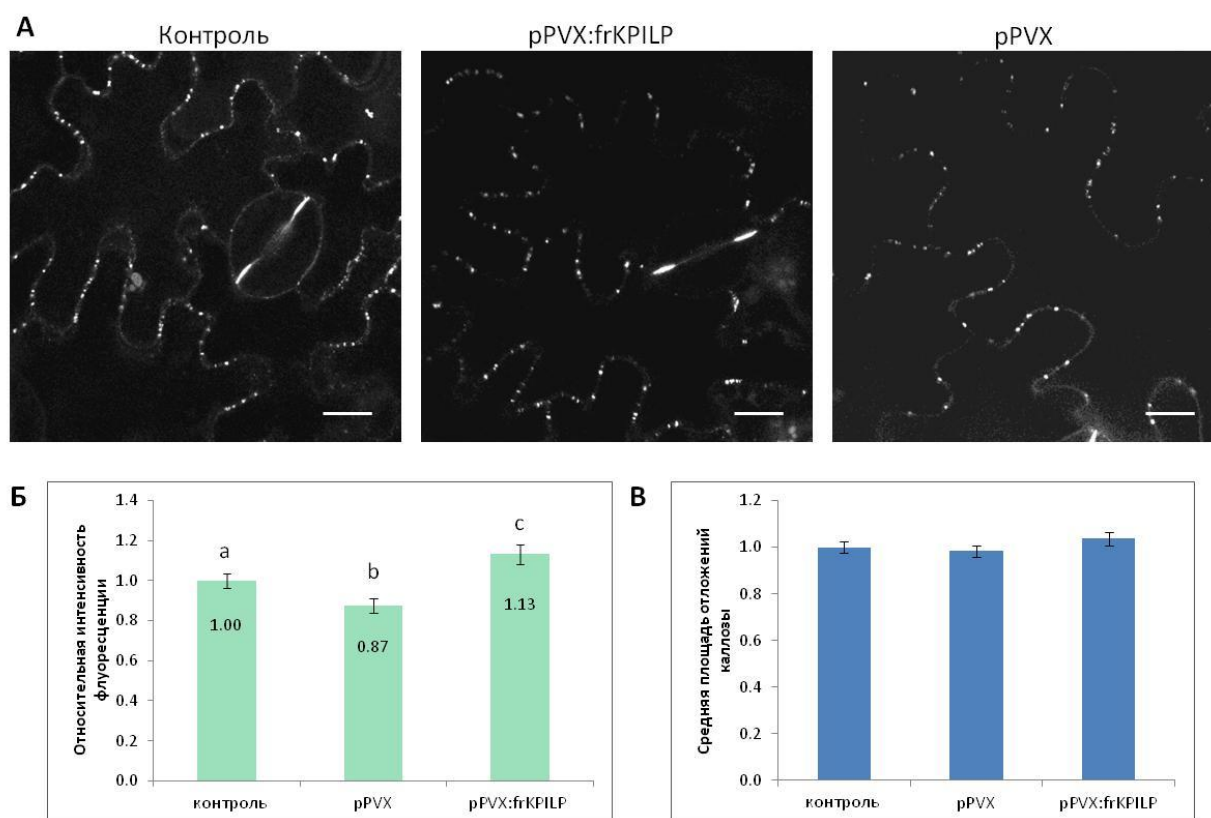


Рисунок 9. *NbKPILP* участвует в регуляции отложений каллозы вокруг плазмодесм. А – флуоресцентные изображения каллозы, окрашенной анилиновым синим. Листья контрольных незараженных растений и растений с системной инфекцией pPVX или pPVX:frKPILP инфильтрировали раствором анилинового синего и анализировали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Масштабная линейка = 20 мкм. Б и В – относительная интенсивность флуоресценции, отражающая количество каллозы вокруг ПД (Б) и средняя площадь каллозных отложений (В) в листьях растений с

системной инфекцией pPVX и pPVX:frKPILP по сравнению в интактными. Уровень каллозы в контрольных растениях принят за 1. Разные буквы над столбцами указывают, что различия статистически значимы при $p < 0,05$ (ANOVA, HSD Tukey).

Чтобы исследовать влияние повышенной экспрессии *NbKPILP* на регуляцию проницаемости ПД, был оценен уровень отложений каллозы в листьях интактных растений *N. benthamiana* и в системно инфицированных pPVX и pPVX:frKPILP растениях. Каллозу окрашивали анилиновым синим (рис. 9А) и оценивали количественно по интенсивности флуоресценции красителя, связавшегося с каллозой (Zavaliev and EpeI, 2015). Уровень отложений каллозы в зараженных ХБК растениях с повышенной экспрессией *NbKPILP* был снижен на 13% по сравнению с интактными растениями, в то время как в листьях с подавленной экспрессией *NbKPILP* наблюдалось увеличение на 13% (рис. 9Б). Примечательно, что количество флуоресцентных точек и их средняя площадь не различались между проанализированными образцами. Это указывает на отсутствие существенных изменений количества ПД на единицу площади и морфологии ПД по сравнению с контрольными растениями. Таким образом, показано, что *NbKPILP* участвует в регуляции отложений каллозы вокруг плазмодесм во время вирусной инфекции, способствуя ее деградации.

Выявление роли *NbKPILP* в регуляции ближнего транспорта и репродукции ВТМ и крВТМ

Способствуя деградации каллозы вокруг ПД, *NbKPILP*, таким образом, может являться позитивным регулятором межклеточного транспорта, в том числе и при вирусной инфекции. Для оценки влияния *NbKPILP* на ближний транспорт вируса были использованы вирусные векторы на основе генома ВТМ (TMV:GFP, рис. 10А) и крВТМ (сгTMV:GFP, рис. 11А), в которых ген белка оболочки заменен на ген *GFP*. Три группы растений вышеописанной модельной системы: (1) с повышенной экспрессией *NbKPILP* (группа pPVX), (2) с подавленной экспрессией *NbKPILP* (группа pPVX:frKPILP) и (3) контрольные, заражали вирусными векторами на основе генома тобамовирусов. Доставку генетического материала осуществляли с помощью агроинфильтрации. Для получения одиночных клеток, трансформированных TMV:GFP или сгTMV:GFP, с дальнейшим развитием отдельных очагов инфекции, использовали оптимизированные разведения суспензий аргобактерий. Визуализация отдельных фокусов инфекции, содержащих GFP, была произведена через 4 дня после агроинфильтрации (рис. 10Б и рис. 11Б), а последующая количественная оценка позволила оценить эффективность репликации и межклеточного транспорта. Результаты, представленные на рисунках 10 и 11,

демонстрируют, что количество фокусов, содержащих GFP, значительно ниже в контрольных растениях и растениях с подавленной экспрессией *NbKPILP* по сравнению с растениями с активированной экспрессией *NbKPILP*.

Для оценки эффективности ближнего транспорта и репродукции тобамовирусов была количественно определена площадь фокусов, содержащих GFP, и интенсивность флуоресценции в каждой экспериментальной группе. Количество более крупных очагов (100-300 пикселей) является самым высоким у растений с повышенной экспрессией *NbKPILP*, в то время как количество мелких очагов (2-49 пикселей) является самым низким в этой группе (рис. 10В и 11В), то есть наиболее эффективный межклеточный транспорт исследуемых тобамовирусов связан с повышенной экспрессией *NbKPILP*. Интенсивность флуоресценции GFP в каждом очаге отражает уровень репродукции вирусного вектора и накопления GFP. Наибольшая интенсивность также наблюдается у растений с повышенной экспрессией *NbKPILP* (рис. 10Г и 11Г).

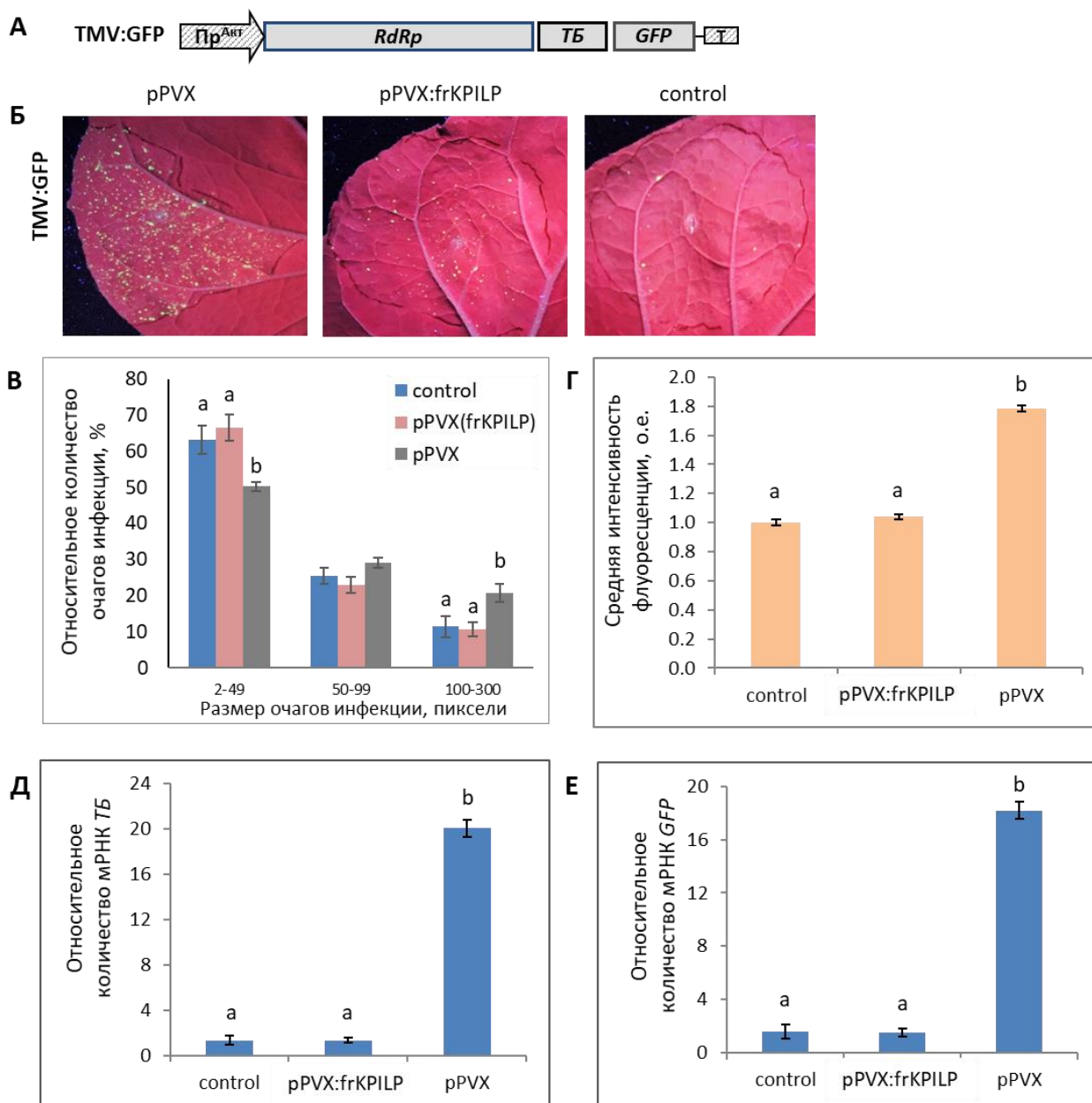


Рисунок 10. NbKPILP стимулирует репродукцию и межклеточный транспорт ВТМ. А – схематическое изображение вектора TMV:GFP на основе генома ВТМ. Пр^{АКТ} – промотор гена *Act2 Arabidopsis thaliana*; *RdRp*, ген репликазы; *TB*, ген транспортного белка; *GFP* – ген зеленого флуоресцентного белка, замещающего ген *BO*; T, терминатор транскрипции. Б – изображения листьев в ультрафиолетовом свете на 4 день после агроинфильтрации TMV:GFP. В – процент очагов разного размера, экспрессирующих TMV:GFP. Г – средняя интенсивность флуоресценции GFP в анализируемых очагах. Д и Е – относительное количество транскриптов генов *TB* и *GFP*, синтезированных с вирусного вектора TMV:GFP. Представленные на гистограммах В-Е данные проанализированы с использованием ANOVA. В качестве контроля (control) использованы листья не инфицированных ХБК растений. Разные буквы над столбцами указывают, что различия статистически значимы при $p < 0.05$ (HSD Tukey).

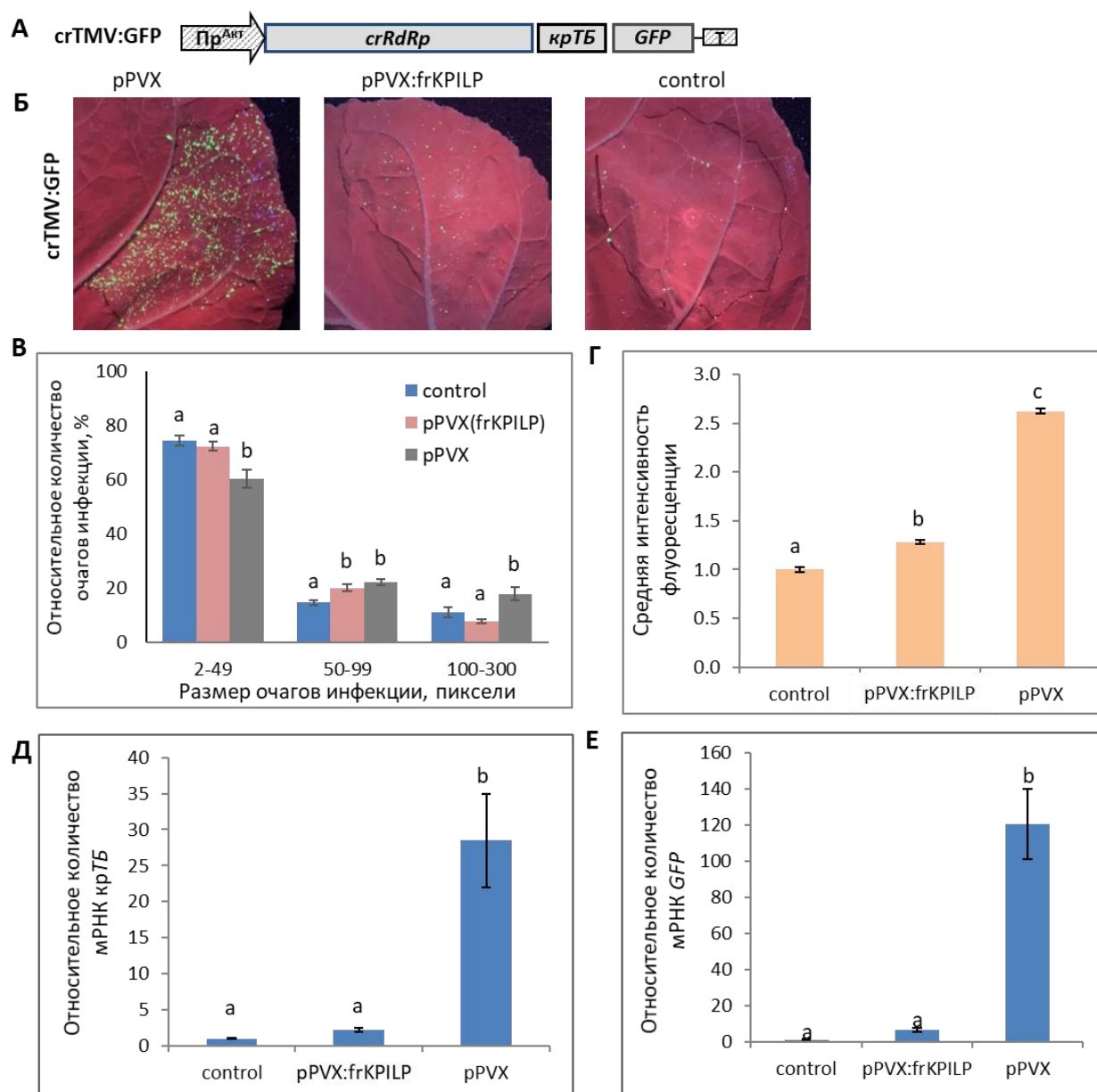


Рисунок 11. NbKPILP стимулирует репродукцию и межклеточный транспорт крВТМ. А – схематическое изображение вектора crTMV:GFP на основе генома крВТМ. Пр^{Акт} – промотор гена *Act2 Arabidopsis thaliana*; crRdRp, ген репликазы; ТБ, ген транспортного белка крВТМ; GFP – ген зеленого флуоресцентного белка, замещающего ген БО; Т, терминатор транскрипции. Б – изображения листьев в ультрафиолетовом свете на 4 день после агроинфильтрации crTMV:GFP. В – процент очагов разного размера, экспрессирующих crTMV:GFP. Г – средняя интенсивность флуоресценции GFP в анализируемых очагах. Д и Е – относительное количество транскриптов генов ТБ и GFP, синтезированных с вирусного вектора crTMV:GFP. Представленные на гистограммах В-Е данные проанализированы с использованием ANOVA. В качестве контроля (control) использованы листья не инфицированных ХБК растений. Разные буквы над столбцами указывают, что различия статистически значимы при $p < 0.05$ (HSD Tukey).

Дополнительно была проведена оценка уровня накопления вирусной РНК, кодирующей ТБ и GFP в зонах инфильтрации TMV:GFP. При повышенной экспрессии

NbKPILP соответствующие транскрипты накапливались примерно в 20 раз эффективнее, чем в растениях с подавленной экспрессией *NbKPILP* и контрольных растениях (рис. 10Д и Е). Аналогичные результаты были получены на растениях, инокулированных *srTMV:GFP* (рис. 11Д и Е). Это указывает на то, что репродукция тобамовирусов подавляется при подавлении экспрессии *NbKPILP*.

Эффективность агробактериальной трансформации растений зависит от множества факторов, и сама по себе агробактериальная инфекция является стрессовым фактором. В созданной модельной системе на основе ХВК тобамовирусные векторы доставляли путем агроинфильтрации, когда уровень экспрессии *NbKPILP* уже был предварительно изменен: в случае *pPVX* – повышен, а в случае *pPVX:frKPILP* снижен. Таким образом, нельзя исключать, что это потенциально могло приводить к разной эффективности трансформации растительных клеток агробактериями. Чтобы исключить влияние этого предполагаемого эффекта и дополнительно подтвердить, что подавление экспрессии *NbKPILP* отрицательно влияет именно на репродукцию тобамовирусов, был использован следующий экспериментальный подход. Подавление *NbKPILP* вызывали с помощью временно экспрессируемой кассеты *35S-siKPILP* (рис. 12А), кодирующей 346-нуклеотидный фрагмент *NbKPILP* в смысловой и антисмысловой ориентации, разделенные интроном из гена пируват ортофосфат дикиназы (PDK) *Flaveria trinervia*. При транскрипции *35S-siKPILP* в растительной клетке синтезируется единая РНК, содержащая оба фрагмента *NbKPILP*, разделенные интроном. При выходе из ядра интрон сплайсируется, а в цитоплазме накапливается дцРНК *siKPILP*, которая индуцирует подавление экспрессии эндогенного *NbKPILP* через механизм РНК интерференции. Векторы *TMV:GFP* или *srTMV:GFP* вводили в листья *N. benthamiana* одновременно с конструкцией *35S-siKPILP* или *pCambia1300* в качестве контроля. Экспрессия *35S-siKPILP* была подтверждена ОТ-кПЦР (рис. 12Б и В) и приводила к ~5-кратному снижению уровня эндогенного *NbKPILP* (рис. 13Б и рис. 14Б).

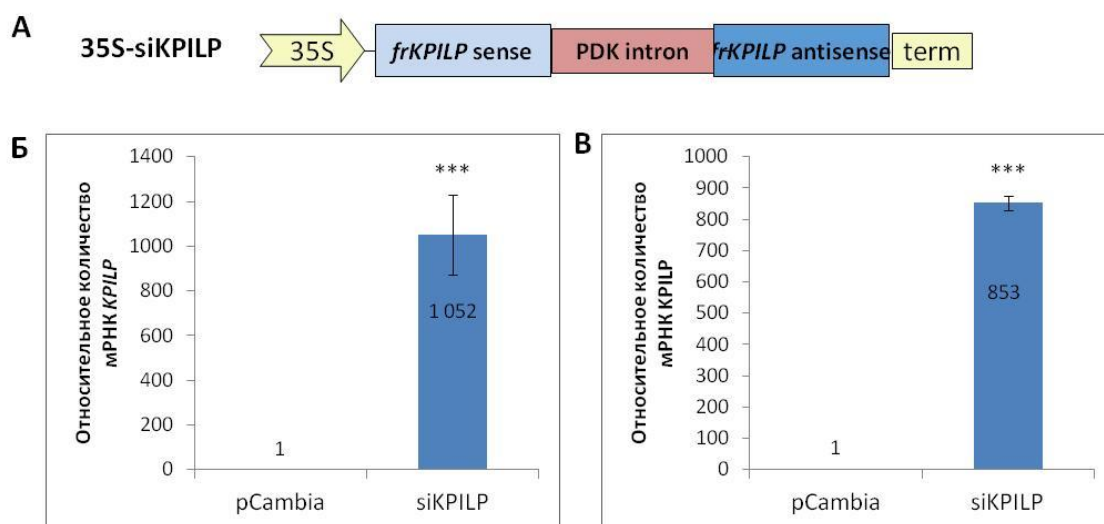


Рисунок 12. Экспрессия конструкции, направляющей накопление siKPILP для индукции РНКи в листьях *N. benthamiana*. А – схематическое изображение конструкции 35S-siKPILP. Б и В – относительное количество мРНК *NbKPILP* (отражающее накопление транскриптов, образующих siKPILP) на 3 день после агроинфильтрации 35S-siKPILP и векторов TMV:GFP (Б) и сгTMV:GFP (В), оцененное ОТ-кПЦР. Уровень накопления мРНК *NbKPILP* в листьях, инокулированных бинарным вектором pCambia был принят за 1. ***, $p < 0,001$ (двухвыборочный t-критерий Стьюдента).

Оптимизированное разведение агробактериальной суспензии позволило получить отчетливые зоны тобамовирусной инфекции (рис. 13А и рис. 14А), размер которых отражал эффективность распространения TMV:GFP или сгTMV:GFP. Результаты количественной оценки размера очагов инфекции (рис. 13В и 14В) показывают, что подавление экспрессии *NbKPILP*, индуцированное siKPILP, приводило к увеличению на ~10% количества мелких очагов (2-99 пикселей) и уменьшению количества более крупных очагов (200-1000 пикселей) в 3 раза по сравнению с контролем (вирусные векторы, коинфильтрированные с pCambia1300). Также был оценен уровень накопления вирусной РНК в зонах инфильтрации TMV:GFP или сгTMV:GFP (рис. 13Г и 14Г). Результаты ОТ-кПЦР показали, что в зонах с подавленной экспрессией *NbKPILP* накопление транскриптов, содержащих ген транспортного белка (ТБ, крТБ) или GFP снижено в ~3 раза по сравнению с контролем. Также следует отметить, что количество очагов инфекции тобамовирусов примерно вдвое меньше при подавлении экспрессии *NbKPILP*.

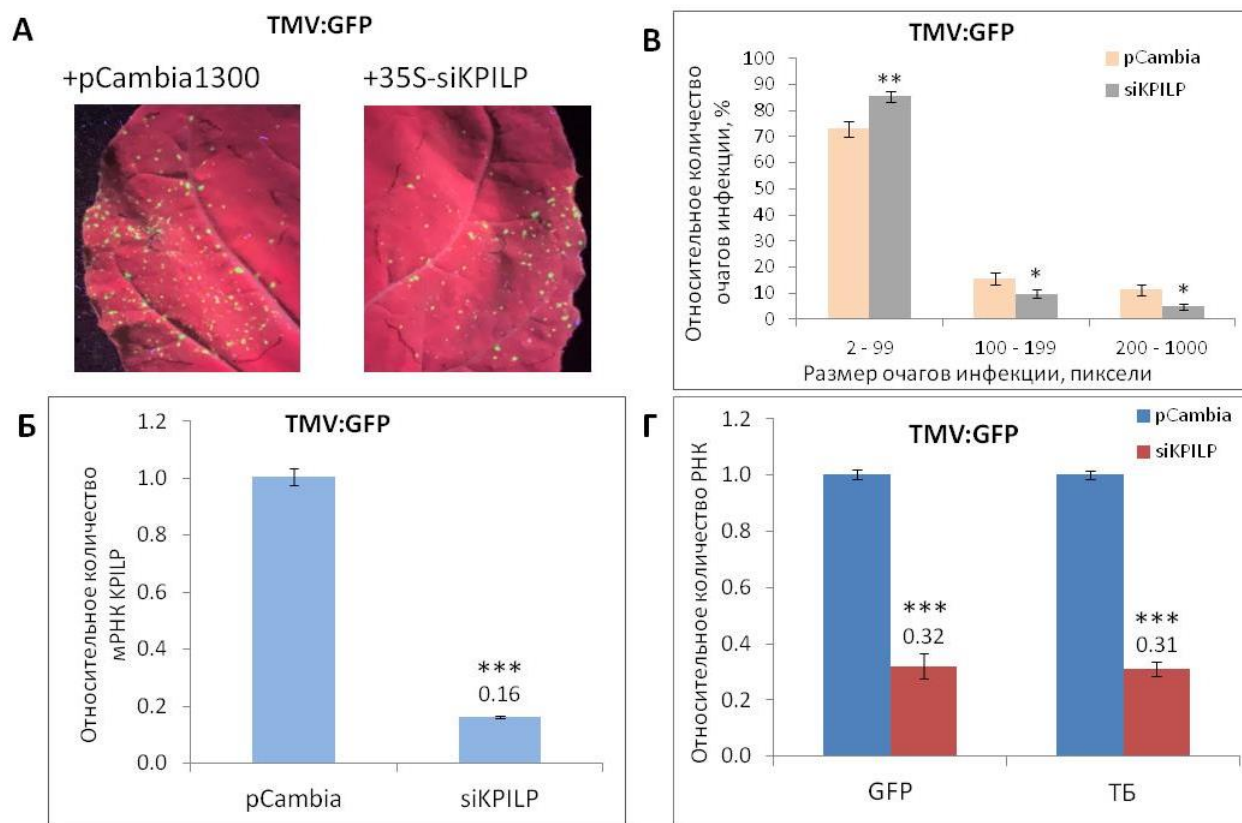


Рисунок 13. Подавление экспрессии *NbKPILP* с помощью транзientной экспрессии 35S-siKPILP снижает эффективность репродукции ВТМ. А – визуализация в ультрафиолетовом свете очагов инфекции в листьях *N. benthamiana*, агроинфицированных TMV:GFP совместно с вектором pCambia (слева) или с 35S-siKPILP (справа) на 3 д.п.и. Б – относительное количество мРНК *NbKPILP* в тех же листьях. В – процент очагов разного размера, экспрессирующих TMV:GFP. Г – относительное количество РНК генов транспортного белка ВТМ (*ТБ*) и *GFP*, оцененное ОТ-кПЦР. На гистограммах Б-Г представлены средние значения и стандартная ошибка. Б и Г, уровень накопления мРНК *NbKPILP* в листьях, агроинфицированных бинарным вектором pCambia, был принят за 1. Данные проанализированы с использованием двухвыборочного t-критерия Стьюдента. ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$, *, $p < 0.05$.

В совокупности эти данные указывают на то, что *NbKPILP* не влияет на эффективность агробактериальной трансформации, но влияет на развитие вирусной инфекции. Таким образом, было показано, что повышение экспрессии *NbKPILP* способствует тобамовирусной инфекции как на уровне накопления РНК, так на уровне межклеточного транспорта.

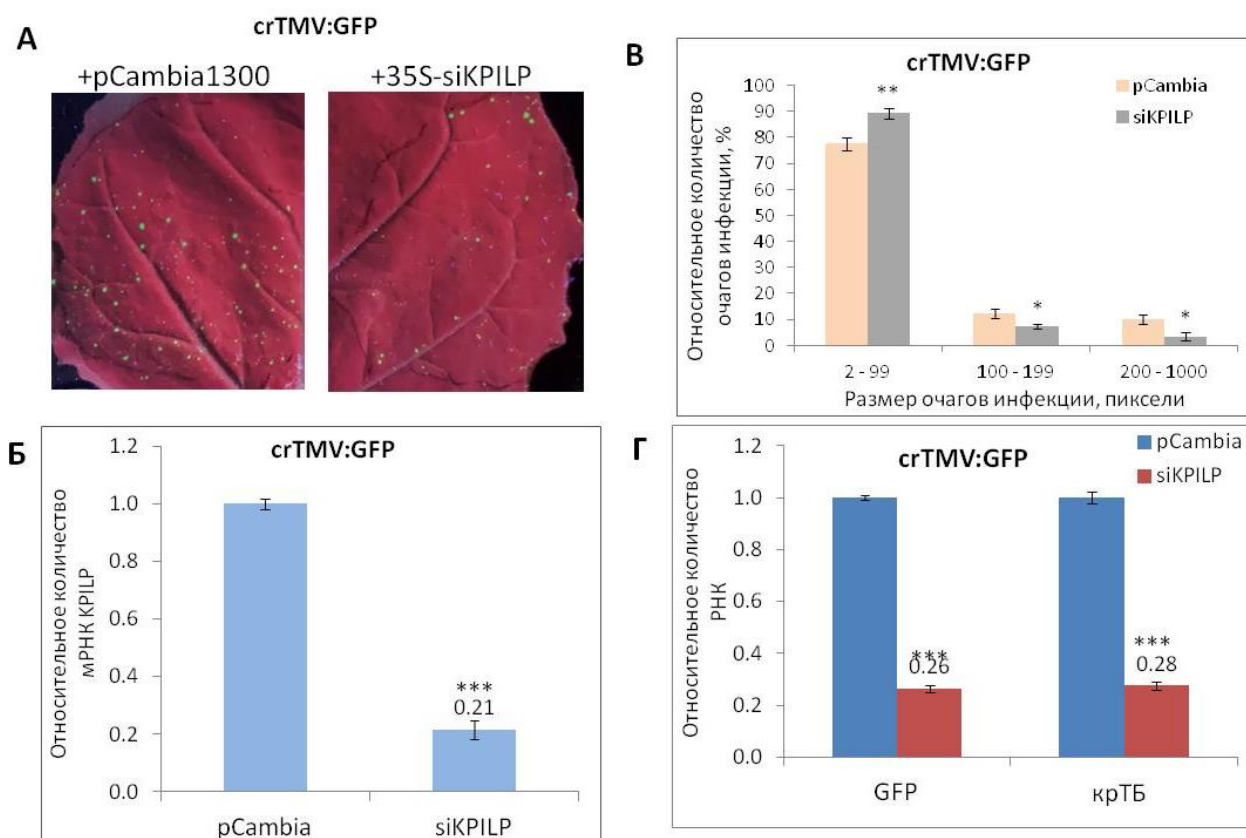


Рисунок 14. Подавление экспрессии *NbKPILP* с помощью siKPILP снижает эффективность репродукции крВТМ. А – визуализация в ультрафиолетовом свете очагов инфекции в листьях *N. benthamiana*, агроинфильтрированных crTMV:GFP совместно с вектором pCambia (слева) или с 35S-siKPILP (справа) на 3 д.п.и. Б – относительное количество мРНК *NbKPILP* в тех же листьях. В – процент очагов разного размера, экспрессирующих crTMV:GFP. Г – относительное количество РНК генов транспортного белка крВТМ (*крТБ*) и *GFP*, оцененное ОТ-кПЦР. На гистограммах Б и Г уровень накопления мРНК *NbKPILP* в листьях, инокулированных бинарным вектором pCambia был принят за 1. Данные проанализированы с использованием двухвыборочного t-критерия Стьюдента. ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$, *, $p < 0.05$.

Исследование влияния *NbKPILP* на развитие системной инфекции ВТМ и крВТМ

Для оценки роли *NbKPILP* в развитии системной тобамовирусной инфекции были использованы растения вышеописанной модельной системы: с повышенной и подавленной экспрессией *NbKPILP*, индуцированной векторами pPVX или pPVX:frKPILP, соответственно, и интактные растения того же возраста. Все три группы были инфицированы ВТМ или крВТМ для получения системной инфекции. Эксперименты были повторены дважды. В ходе проведения экспериментов было произведено наблюдение за развитием симптоматики, характерной для тобамовирусной инфекции, а именно, некротическое поражение листьев, стебля и черешков, увядание верхушечной

части во всех группах растений, а также зафиксировано время гибели. Важно отметить, что системная инфекция ВТМ и крВТМ часто приводит к возникновению системных некрозов с последующей гибелью растений *N. benthamiana* (рис. 15), в отличие от растений *N. tabacum*. Время проведения экспериментов составляло 40 дней. В группе моск-инокулированных, не зараженных ни одним из вирусов, растений выживаемость на протяжении периода наблюдения составила 100%. Динамика смертности инфицированных растений к 40-му дню представлена на рисунке 16 А и Б.



Рисунок 15. Внешний вид растений *N. benthamiana* с системной инфекцией ВТМ (А) и крВТМ (Б).

Вирус-индуцированное подавление экспрессии *NbKPILP* вдвое снижает уровень смертности инфицированных ВТМ растений по сравнению с контрольной группой или с растениями с повышенным уровнем *NbKPILP* (рис. 16А). Однако, инфекция крВТМ не столь чувствительна к отсутствию *NbKPILP*: 90% растений из экспериментальной группы с подавленной экспрессией *NbKPILP* погибли к 40-му дню после инфицирования (рис. 16Б).

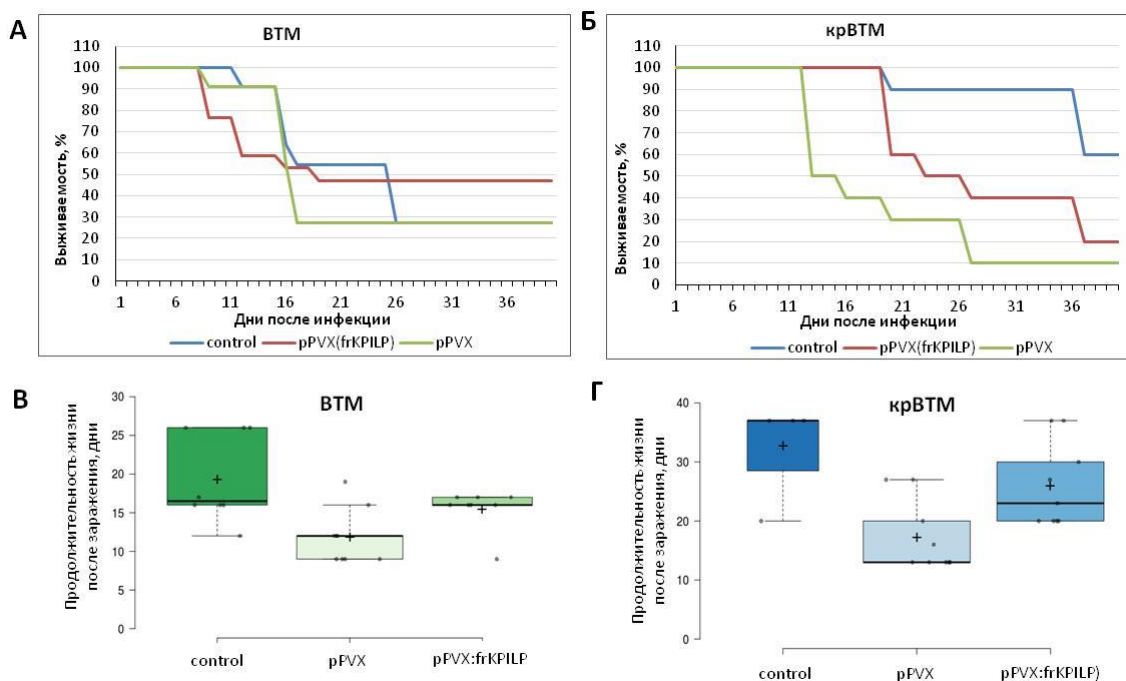


Рисунок 16. Подавление экспрессии *NbKPILP* приводит к повышению устойчивости *N. benthamiana* к тобамовирусной инфекции. А и Б – выживаемость растений *N. benthamiana*, инфицированных ВТМ (А) и крВТМ (Б). В и Г – оценка продолжительности жизни растений *N. benthamiana*, инфицированных ВТМ (В) и крВТМ (Г). В эксперименте использованы растения, инфицированные ХВК (pPVX), растения с сайленсингом *NbKPILP* (pPVX:frKPILP) и контрольные (control), выживаемость моск-инокулированных растений составила 100% на протяжении периода наблюдения; данные представлены как 25% и 75% процентиля (границы коробки), максимальное и минимальное значение - верхняя и нижняя границы усов, выпадающие значения обозначены отдельно стоящими точками.

Еще один параметр, который был проанализирован – это средняя продолжительность жизни растений в каждой группе. Большинство растений, инфицированных pPVX, погибли примерно через две недели после заражения ВТМ, а их среднее время жизни составило $11,9 \pm 1,2$ дней, в то время как растения с подавленным *NbKPILP* имели немного большую продолжительность жизни ($15,5 \pm 0,9$ дней). Среднее время жизни растений контрольной группы составило $19,4 \pm 2$ дней (рис. 16В). В случае заражения крВТМ половина растений, инфицированных pPVX, погибла через две недели, а средняя продолжительность жизни в этой группе составила $17 \pm 1,9$ дней (рис. 16Г). В группе растений, инфицированных pPVX:frKPILP и подавленным уровнем экспрессии *NbKPILP*, среднее время жизни было больше, чем в группе растений, инфицированных pPVX, и составило $26 \pm 2,3$ дней. А среднее время жизни в контрольной группе без инфекции ХВК составило $32,8 \pm 4,3$ дней. Таким образом, растения с вирус-индуцированным сайленсингом *NbKPILP* продемонстрировали повышенную

устойчивость к инфекции ВТМ и крВТМ по сравнению с растениями с активированной экспрессией *NbKPILP*, для которых была характерна более высокая смертность и скорость развития симптоматики. Приведенные результаты позволяют утверждать, что *NbKPILP* стимулирует развитие этих тобамовирусов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Вирусная инфекция вызывает множественные изменения в клетках растения-хозяина, приводя к индукции экспрессии одних генов и подавлению других. Клеточные факторы, кодируемые этими генами, могут иметь как провирусную активность, так и противовирусную, то есть являться как факторами чувствительности к инфекции, так и факторами резистентности. Измененный паттерн экспрессии генов на фоне вирусной инфекции приводит к существенным модификациям многих внутриклеточных систем. В частности, хлоропласты, которые играют важную роль в процессах развития, роста и защитных реакциях растений (Inaba and Ito-Inaba, 2010), являются мишенью для вирусных белков (Qiao et al., 2009; Bhattacharyya and Chakraborty, 2018). Помимо того, что хлоропласты отвечают за синтез фотоассимилятов, в них локализовано множество метаболических путей, продукты которых определяют физиологический статус клетки и включаются в сигнальные пути передачи сигнала от пластид в ядро. Прямое или опосредованное клеточными факторами воздействие на хлоропласты и фотосинтез позволяет вирусу регулировать клеточный метаболизм, подавлять защитные реакции и тем самым создавать благоприятные условия для эффективной репродукции и распространения по организму. Данная работа описывает роль стресс-индуцируемого клеточного фактора *NbKPILP* в системе взаимодействий вирус-растение. Экспрессия *NbKPILP* активируется в ответ на инфекцию ХВК, ВТМ и крВТМ в растениях *N. benthamiana* (рис. 5). Ранее было показано, что уровень мРНК *NbKPILP* повышается при длительной инкубации растений в темноте. Более того, известно, что в растениях *N. tabacum* с системной инфекцией ВТМ повышенная экспрессия *NtKPILP* коррелирует с активной вирусной репродукцией, как показано для разных зон листьев с мозаикой (Sheshukova et al., 2017). Для выявления роли и определения функции *NbKPILP* при вирусной инфекции была разработана модельная система, которая позволила отслеживать эффекты повышенной и пониженной экспрессии *NbKPILP*. Системная инфекция ХВК приводила к активации экспрессии *NbKPILP* (рис. 6). А для индукции сайленсинга *NbKPILP* использовали вирусный вектор pPVX:frKPILP, содержащий участок гена *NbKPILP* под дублированным промотором гена белка оболочки. Модельная система

включала в себя три группы растений: интактные (группа контроль), инфицированные ХВК с повышенной экспрессией *NbKPILP* (группа pPVX) и инфицированные ХВК с подавленной экспрессией *NbKPILP* (группа pPVX:frKPILP). Все три группы растений модельной системы были охарактеризованы по уровню накопления мРНК *NbKPILP* (рис. 6) и их физиологического статуса. Во-первых, продемонстрировано, что *NbKPILP* участвует в регуляции ретроградных сигналов хлоропластов на фоне развивающейся инфекции ХВК. Анализ накопления мРНК ядерных генов, которые в норме обеспечивают функционирование хлоропластов и фотосинтеза, показал обратную корреляцию между экспрессией *NbKPILP* и *LHCB1*, *LHCB2*, *RBCS1A* и *HEMA1*: при повышенной экспрессии *NbKPILP* как на фоне инфекции ХВК, так и транзистентно направляемой 35S-промотором экспрессия вышеперечисленных генов подавлена, а на фоне сайленсинга *NbKPILP* подавление экспрессии *LHCB1* и *LHCB2* происходит в меньшей степени, чем при повышенной экспрессии *NbKPILP*, и не происходит подавление экспрессии *RBCS1A* и *HEMA1* (рис. 7). Принимая во внимание, что (1) *NbKPILP* экспрессируется в корнях, но не в зрелых фотосинтетически активных интактных листьях, (2) экспрессия *NbKPILP* в листьях активируется в ответ на длительную инкубацию в темноте (Sheshukova et al., 2017), можно предположить, что его активация при вирусной инфекции происходит по тому же пути, что и в условиях световой депривации, и оба пути связаны с клеточной фотосинтетической активностью и экспрессией генов, ассоциированных с фотосинтезом. То есть активация экспрессии *NbKPILP* в листьях приводит к нарушению функции хлоропластов, а именно, нарушению формирования антенн светособирающих комплексов фотосистем, нарушению биосинтеза тетрапиррола, а значит и хлорофилла, и нарушению углеродного метаболизма. Поэтому на следующем этапе был оценен уровень продуцируемых и накапливаемых фотоассимилятов в растениях модельной системы. Проведен сравнительный анализ количества глюкозы в фотосинтетически активных source-листьях, продуцирующих основное количество фотоассимилятов, и в частях растений, принимающих фотоассимиляты (sink) (рис. 8). Данный анализ показал, что *NbKPILP* участвует в распределении глюкозы и углеродном обмене в листьях, инфицированных ХВК, поскольку, во-первых, при инфицировании ХВК в группе pPVX с повышенной экспрессией *NbKPILP* значительно снижен уровень продуцируемой и накапливаемой глюкозы в обеих частях растений. Во-вторых, в группе растений pPVX:frKPILP с подавленной экспрессией *NbKPILP* уровень глюкозы в три раза выше в source-листьях, чем в тех же листьях растений группы pPVX, и в 2 раза выше в sink-частях, что соответствует уровню глюкозы в sink-частях группы интактных растений (контроль). Полученные результаты позволяют заключить, что *NbKPILP* отрицательно

влияет на накопление фотоассимилятов при вирусной инфекции, подавляя экспрессию ядерных генов, участвующих в фотосинтезе.

Репродукция вируса и активация противовирусной защиты, например, деградация вирусной РНК через механизм РНК интерференции, - очень энергозатратный процесс для клетки (Nagy and Lin, 2020). Генетические и метаболические изменения, происходящие в инфицированных тканях, приводят к истощению фотоассимилятов, необходимых для синтеза новых белков и энергии для биосинтетических процессов (Zhao et al., 2016). Хлоропласты являются не только источником фотоассимилятов, но и генерируют различные фитогормоны и активные формы кислорода, которые являются стратегическими активаторами защитных путей в клетках (Kuźniak and Korczewski, 2020). Углеродное истощение на фоне вирусной инфекции может быть следствием перераспределения энергетических ресурсов от нормального метаболизма к активации защитных реакций растений с последующим вирус-индуцированным подавлением этих защитных реакций и использованием клеточных ресурсов вирусом для репродукции. В настоящей работе приведены доказательства, что подавление экспрессии *NbKPILP* на фоне развития инфекции ХБК приводит к тому, что экспрессия ядерных генов, ассоциированных с фотосинтезом, остается на том же уровне, что и в неинфицированных контрольных растениях, либо подавляется, но в меньшей степени, чем при активированной экспрессии *NbKPILP*. Также при сайленсинге *NbKPILP* происходит восстановление уровня глюкозы до уровня, характерного для sink-частей контрольных растений, и частичное восстановление в source-листьях. Визуальное наблюдение за группами рPVX и рPVX:frKPILP не выявило видимых отличий между ними. Но стоит отметить, что обе эти группы проявляли задержку в росте по сравнению с контрольной группой интактных растений. Развитие симптомов инфекции ХБК происходило синхронно в обеих группах. При этом уровень репродукции вируса, а именно, накопление РНК, кодирующей репликазу ХБК, не показал статистических значимых различий. Но вопрос о том, влияет ли *NbKPILP* на защитные реакции при развитии инфекции ХБК, остается открытым и требует дальнейшего изучения.

Еще одна функция *NbKPILP* связана с регуляцией межклеточного транспорта: в группе рPVX повышенная экспрессия *NbKPILP* приводит к уменьшению отложений каллозы вокруг плазмодесм, что в свою очередь активирует межклеточный транспорт, в том числе и транспорт вируса. И, наоборот, в группе рPVX:frKPILP с подавленной экспрессией *NbKPILP* уровень каллозы выше, чем в контрольной, что судя по всему и лежит в основе механизма ограничения межклеточного транспорта вируса. Каллоза –

полисахарид клеточной стенки, который накапливается вокруг канала плазмодесмы, и это приводит к уменьшению пропускной способности ПД. Каллоза-опосредованный способ закрытия плазмодесм – один из механизмов регуляции межклеточного транспорта. В основе этого механизма лежит слаженная работа каллозасинтаз и бета-глюканаз. Помимо этих двух групп ферментов в регуляции уровня каллозы участвует множество других клеточных факторов с локализацией как в плазмодесмах, так и в других клеточных компартментах (Zavaliev et al., 2011; Wu et al., 2018; Dorokhov et al., 2019; Zanini and Burch-Smith, 2024). Наличие сигнального пептида в составе белка NbKPILP (Sheshukova et al., 2017b) позволяет предположить, что он проходит традиционный путь внутриклеточной секреции и, возможно, локализуется в клеточной стенке и/или в области плазмодесм. Поскольку не производилось детального исследования локализации NbKPILP в клетке, то механизм его действия в отношении регуляции уровня каллозы остается неизвестным: возможно как непосредственное воздействие на ферменты, регулирующие уровень каллозы, так и опосредованная регуляция ее уровня через воздействие на систему передачи операционных ретроградных сигналов хлоропластов.

Известно, что хлоропласты участвуют в противовирусной иммунной защите (Nomura et al., 2012; Serrano et al., 2016; Medina-Puche et al., 2020). В работе показано, что вирусная инфекция приводит к подавлению экспрессии ядерных генов, кодирующих основные компоненты фотосинтетического аппарата листьев. Очевидно, что характер экспрессии генов в фотосинтетически активных и нефотосинтетических тканях принципиально отличается. Гены, экспрессия которых активна в корнях, не подвергаются воздействию света и не активны в листьях, а экспрессия генов, ассоциированных с фотосинтезом, там подавлена. Одной из успешных стратегий вирусной инфекции может быть стратегия «выключения» в листьях генов, ассоциированных с фотосинтезом (PhANG), посредством активации экспрессии регуляторных генов, в норме активных только в корнях, с целью подавления противовирусного иммунитета, запускаемого операционными ретроградными сигналами от хлоропластов. Помимо воздействия на иммунную систему растений, вирус может также модулировать экспрессию генов, которые регулируют межклеточный и дальний транспорт таким же образом, тем самым создавая благоприятные условия для размножения и распространения инфекции. Основываясь на таком предположении, результаты, представленные в работе, интегрируются в гипотезу ONPS: активация экспрессии *NbKPILP* приводит к изменению паттерна ретроградных сигналов, что, в свою очередь, приводит к изменению экспрессии генов PhANG и генов, регулирующих биогенез и функцию ПД. В нормальных же

условиях и при отсутствии стрессового воздействия экспрессия *NbKPILP* подавлена, хлоропласты передают в ядро биогенные сигналы, являющиеся индикатором нормального физиологического состояния. В зараженных вирусом листьях активная экспрессия *NbKPILP* запускает регуляторный путь, в котором экспрессия некоторых PhANG снижается и активируется экспрессия генов, стимулирующих межклеточный транспорт. Подавление противовирусной защиты на фоне дисфункции хлоропластов и активация межклеточного транспорта в совокупности создают благоприятные условия для размножения и распространения вирусной инфекции. Поэтому на следующем этапе исследования было оценено влияние *NbKPILP* на эффективность репродукции тобамовирусов ВТМ и крВТМ. В листьях трех групп растений с подтвержденным уровнем экспрессии *NbKPILP* был оценен локальный транспорт и эффективность репликации ВТМ и крВТМ при использовании вирусных векторов TMV:GFP и сгTMV:GFP, соответственно (рис. 10 и 11). Полученные результаты (рис. 10 и 11) показали, что существует положительная корреляция между уровнем экспрессии *NbKPILP* и эффективностью заражения тобамовирусами: в растениях с повышенным уровнем *NbKPILP* ближний транспорт и накопление вирусных транскриптов происходило эффективнее по сравнению с контрольной группой растений и группой с подавленной экспрессией *NbKPILP*. Важно отметить, что в этой экспериментальной системе уровень многих генов, в том числе *NbKPILP*, был предмодифицирован до инфильтрации агробактерией, содержащей вирусные векторы, что могло сказаться на эффективности самой доставки векторов в клетки листьев при агротрансформации. Поэтому для исключения влияния *NbKPILP* на агробактериальную трансформацию растительных клеток был использован другой экспериментальный подход, а именно, одновременная доставка плазмиды, кодирующей вирусный вектор, и конструкции 35S-siKPILP для индукции сайленсинга *NbKPILP*. Подавление *NbKPILP* в этих экспериментах также приводило к снижению эффективности репродукции вирусов: накопления транскриптов и ближнего транспорта (рис. 13 и 14), кроме того, уменьшалось количество очагов инфекции. В совокупности эти результаты позволяют заключить, что *NbKPILP* не влияет на доставку генетического материала агробактериями, но оказывает специфическое воздействие на вирус и играет важную роль в развитии тобамовирусной инфекции.

На следующем этапе была оценена чувствительность модельных растений к развитию системной тобамовирусной инфекции. Оценивали время развития наиболее тяжелых симптомов, продолжительность жизни и выживаемость этих растений. На рисунке 15 представлены растения, у которых активирован *NbKPILP*. Они обладают

повышенной восприимчивостью к инфекции (рис. 16). Это проявляется в более короткой продолжительности жизни и уменьшении доли выживших по сравнению с группой растений с нокдауном *NbKPILP* или контрольной группой. Растения со сниженной экспрессией *NbKPILP* продемонстрировали повышенную устойчивость к инфекции ВТМ и крВТМ: продолжительность жизни увеличивалась, а процент погибших к 40-му дню после инокуляции растений был ниже. Согласно наблюдениям за развитием тобамовирусной инфекции, не было существенной разницы между растениями, инфицированными ВТМ или крВТМ: симптомы были схожими. Более того, выжившие растения с подавленным *NbKPILP* имели внешний вид, аналогичный растениям из контрольной группы.

В чувствительном хозяине быстрое развитие тобамовирусной инфекции возможно только при благоприятных условиях для всех стадий заражения, от «распаковки» вириона до проникновения в сосудистую систему. ВТМ достигает сосудистой системы через 16-18 часов после заражения (Nilsson-Tillgren et al., 1969). Такое быстрое распространение внутри растения может произойти только при синхронизации следующих событий: эффективной экспрессии и репликации вирусного генома, синтеза вирусных белков, подавления противовирусного ответа и активации межклеточного транспорта. Можно предположить, что начальная активация клеточных факторов, используемых вирусом, может быть вызвана БО вируса, который первым попадает в клетку при заражении в составе вириона, или ТБ, небольшие количества которого могут синтезироваться непосредственно на матрице геномной РНК ВТМ или крВТМ. Такая особенность ТБ была продемонстрирована для ВТМ и крВТМ, геном которых содержит сайт внутренней посадки рибосомы (IRES) ($IRES_{MP,75}^{U1}$ и $IRES_{MP,75}^{CR}$, соответственно), направляющий трансляцию ТБ непосредственно с геномной РНК (Dorokhov et al., 1993; Dorokhov YuL et al., 1994; Skulachev et al., 1999). Можно предположить, что ТБ и/или БО индуцируют экспрессию *NbKPILP* на начальных стадиях инфекции напрямую или через другие клеточные факторы. В любом случае, в ответ ли на конкретные компоненты вируса или вследствие генерализованного ответа клетки на инфекцию, экспрессия *NbKPILP* резко активируется. И уже на ранних этапах развития инфекции *NbKPILP* запускает необратимые изменения в фотосинтетическом аппарате и активацию межклеточного транспорта. Хотя *NbKPILP* не был обнаружен в хлоропластах, существует четкая обратная корреляция между фотосинтезом и экспрессией *NbKPILP*, активированной во время заражения тобамовирусами. Более того, вирус, по всей видимости, «использует»

NbKPILP для подавления активности хлоропластов, тем самым влияя на противовирусный ответ и регулируя межклеточный и дальний транспорт.

На основании полученных результатов *NbKPILP* можно рассматривать как провирусный клеточный фактор и одну из генетических детерминант восприимчивости, «спящую» в надземных частях интактного растения, но активируемую вирусной инфекцией.

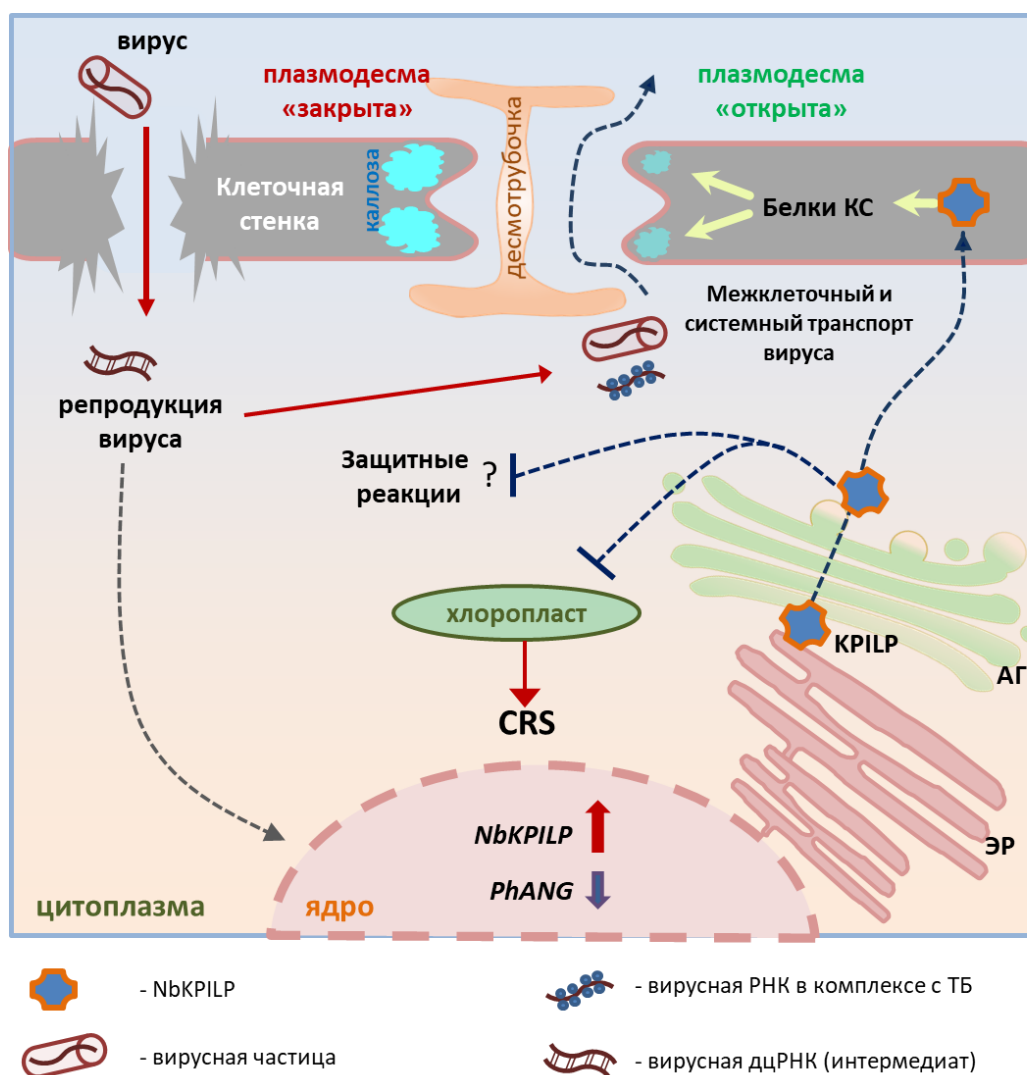


Рисунок 17. Модель, описывающая функции *NbKPILP* на фоне тобамовирусной инфекции. Пояснения в тексте. АГ – аппарат Гольджи; ЭР – эндоплазматический ретикулум; КС – клеточная стенка; CRS – система ретроградного сигналинга хлоропластов; PhANG – ядерные гены, ассоциированные с фотосинтезом (photosynthesis-associated nuclear genes).

На основе полученных результатов предложена модель, описывающая свойства и функции *NbKPILP* в системе взаимодействий вирус-растение (рис. 17). При попадании вирусного генома в клетку происходит активация экспрессии *NbKPILP*. Накопление в инфицированной клетке *NbKPILP* приводит к подавлению экспрессии генов,

ассоциированных с фотосинтезом, функций хлоропластов и изменению паттерна ретроградных хлоропластных сигналов, а также, вероятно, подавлению защитных реакций клетки. Внутриклеточная секреция приводит к накоплению NbKPILP в клеточной стенке и гидролизу каллозы, что может происходить при участии других белков клеточной стенки, поскольку NbKPILP является секретлируемым белком благодаря наличию сигнального пептида. Изменение паттерна ретроградного сигналинга также может приводить к деградации каллозы по другим механизмам. В совокупности, подавление антивирусной защиты клетки и гидролиз каллозы вокруг плазмодесм приводит к активной вирусной репродукции и распространению инфекции по всему растению.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тобамовирусная инфекция у *N. benthamiana* может сопровождаться довольно тяжелой симптоматикой и развиваться в короткие сроки (от 5 до 14 дней). Симптомы выражаются в изменении пигментации листьев, системном некрозе и гибели всего растения, хотя степень поражения зависит от дополнительных факторов, таких как возраст в момент заражения, количество света и температура окружающей среды, а также от инфекции другими вирусами, действующими синергично. У восприимчивого хозяина быстрое развитие вирусной инфекции возможно только при наличии «благоприятных» условий для всех стадий инфекции – от «распаковки» генома вируса до проникновения в сосудистую систему. Такие «благоприятные» условия определяются наличием провирусных факторов в клетке. Одним из провирусных факторов, способствующих быстрому развитию тобамовирусной инфекции у *N. benthamiana* является гомолог ингибитора пептидаз Кунитца, *NbKPILP*. В самом начале настоящего исследования о роли и функциях *NbKPILP* было известно довольно мало: количество его мРНК в корнях значительно превышает уровни в листьях, а экспрессия его гомолога в табаке, *NtKPILP*, коррелирует с накоплением ВТМ в инфицированных листьях. Но какое значение для ВТМ при этом имеет его активация на фоне инфекции – данный вопрос был открыт.

В ходе проведенного исследования был выявлен ряд свойств *NbKPILP*. Во-первых, показано, что экспрессия *NbKPILP* повышается в ответ на заражение таксономически разными вирусами: в тысячи раз в ответ на тобамовирусы и в ~10 раз - на инфекцию потексвируса. В дальнейшем было выявлено, что *NbKPILP* принимает участие в регуляции многих жизненно важных процессов: в метаболизме каллозы вокруг плазмодесм и регуляции межклеточного транспорта, углеродном метаболизме, в регуляции генов, ассоциированных с фотосинтезом, и ретроградном сигналинге. Доказана

однозначная провирусная роль *NbKPILP* для развития тобамовирусных инфекций ВТМ и крВТМ. При этом на развитие потексвирусной инфекции, на первый взгляд, *NbKPILP* влияния не оказывает, хотя детального исследования в отношении ХВК не проводилось.

В исследовании не были оценены изменения уровня экспрессии *NbKPILP* во времени на фоне инфекции ВТМ, но можно предположить, что на ранних стадиях развития инфекции *NbKPILP* участвует в запуске необратимых изменений в фотосинтетическом аппарате и активации межклеточного транспорта. *NbKPILP* не был обнаружен в хлоропластах, но существует четкая обратная корреляция между фотосинтезом и экспрессией *NbKPILP*, активируемой во время тобамовирусной инфекции. Более того, вирусы могут использовать *NbKPILP* для подавления активности хлоропластов, тем самым влияя на противовирусный ответ и регулируя свой транспорт от клетки к клетке и на большие расстояния. На основании полученных результатов можно рассматривать *NbKPILP* как провирусный клеточный фактор и одну из генетических детерминант восприимчивости, «спящую» в надземной части интактного растения, но активируемую вирусной инфекцией. Остается без ответа вопрос о том, оказывает ли тобамовирусная инфекция прямое влияние на экспрессию *NbKPILP*, или же в этом регуляторном пути участвуют и другие белки. Следовательно, поиск потенциальных партнеров *NbKPILP* и клеточных факторов выше и ниже каскада, в котором участвует *NbKPILP*, может пролить свет на других участников этого регуляторного модуля и является предметом дальнейшего исследования.

ВЫВОДЫ

1. Экспрессия *NbKPILP* активируется на фоне развития инфекции X вируса картофеля, вируса табачной мозаики и вируса табачной мозаики крестоцветных у растений *Nicotiana benthamiana*.
2. На фоне вирусного патогенеза *NbKPILP* регулирует физиологический статус растения, а именно, участвует в регуляции ретроградных сигналов хлоропластов, углеводного метаболизма и межклеточного транспорта.
3. *NbKPILP* стимулирует репродукцию и межклеточный транспорт ВТМ и крВТМ.
4. *NbKPILP* способствует развитию системной тобамовирусной инфекции.
5. Подавление экспрессии *NbKPILP* через механизм РНК интерференции повышает выживаемость растений при тобамовирусном патогенезе.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа посвящается светлой памяти моего первого научного руководителя д.б.н, профессора МГУ имени М.В. Ломоносова Дорохова Юрия Леонидовича, до определенного времени направлявшего меня на пути становления как ученого.

Особую благодарность за помощь в подготовке моей диссертационной работы, актуальные советы и рекомендации выражаю моему научному руководителю доктору биологических наук Комаровой Татьяне Валерьевне. Выражаю благодарность коллегам, принимавшим участие в исполнении некоторых экспериментов и дружескую поддержку Поздышеву Денису Валерьевичу, Камаровой Камиле Альбертовне, Шешуковой Екатерине Владимировне, Савченко Ирине Михайловне, Арифину Евгению Альбертовичу, Ташлицкому Вадиму Нероновичу.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Aarts, N., Metz, M., Holub, E., Staskawicz, B. J., Daniels, M. J., and Parker, J. E. (1998). Different requirements for EDS1 and NDR1 by disease resistance genes define at least two R gene-mediated signaling pathways in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 10306–10311.
2. Abbink, T. E. M., Peart, J. R., Mos, T. N. M., Baulcombe, D. C., Bol, J. F., and Linthorst, H. J. M. (2002). Silencing of a gene encoding a protein component of the oxygen-evolving complex of photosystem II enhances virus replication in plants. *Virology* 295, 307–319. doi: 10.1006/viro.2002.1332
3. Alazem, M., and Burch-Smith, T. M. (2024). Roles of ROS and redox in regulating cell-to-cell communication: Spotlight on viral modulation of redox for local spread. *Plant Cell Environ.* doi: 10.1111/pce.14805
4. Albar, L., Bangratz-Reyser, M., Hébrard, E., Ndjiondjop, M.-N., Jones, M., and Ghesquière, A. (2006). Mutations in the eIF(iso)4G translation initiation factor confer high resistance of rice to Rice yellow mottle virus. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 47, 417–426. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02792.x
5. Alcaide-Loridan, C., and Jupin, I. (2012). Ubiquitin and Plant Viruses, Let's Play Together!1. *Plant Physiol.* 160, 72–82. doi: 10.1104/pp.112.201905
6. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732–738. doi: 10.1038/35099560
7. Allan, A. C., Lapidot, M., Culver, J. N., and Fluhr, R. (2001). An Early Tobacco Mosaic Virus-Induced Oxidative Burst in Tobacco Indicates Extracellular Perception of the Virus Coat Protein. *Plant Physiol.* 126, 97–108.
8. Amari, K., Di Donato, M., Dolja, V. V., and Heinlein, M. (2014). Myosins VIII and XI Play Distinct Roles in Reproduction and Transport of Tobacco Mosaic Virus. *PLoS Pathog.* 10, e1004448. doi: 10.1371/journal.ppat.1004448

9. Amsbury, S., Kirk, P., and Benitez-Alfonso, Y. (2018). Emerging models on the regulation of intercellular transport by plasmodesmata-associated callose. *J. Exp. Bot.* 69, 105–115. doi: 10.1093/jxb/erx337
10. Anelli, T., and Sitia, R. (2008). Protein quality control in the early secretory pathway. *EMBO J.* 27, 315–327. doi: 10.1038/sj.emboj.7601974
11. Archibald, J. M. (2015). Genomic perspectives on the birth and spread of plastids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 10147–10153. doi: 10.1073/pnas.1421374112
12. Ashby, J., Boutant, E., Seemanpillai, M., Sambade, A., Ritzenthaler, C., and Heinlein, M. (2006). Tobacco Mosaic Virus Movement Protein Functions as a Structural Microtubule-Associated Protein. *J. Virol.* 80, 8329–8344. doi: 10.1128/jvi.00540-06
13. Austin, M. J., Muskett, P., Kahn, K., Feys, B. J., Jones, J. D. G., and Parker, J. E. (2002). Regulatory role of SGT1 in early R gene-mediated plant defenses. *Science* 295, 2077–2080. doi: 10.1126/science.1067747
14. Azim, M. F., and Burch-Smith, T. M. (2020). Organelles-nucleus-plasmodesmata signaling (ONPS): an update on its roles in plant physiology, metabolism and stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 58, 48–59. doi: 10.1016/j.pbi.2020.09.005
15. Bae, W., Lee, Y. J., Kim, D. H., Lee, J., Kim, S., Sohn, E. J., et al. (2008). AKR2A-mediated import of chloroplast outer membrane proteins is essential for chloroplast biogenesis. *Nat. Cell Biol.* 10, 220–227. doi: 10.1038/ncb1683
16. Baillie, A. L., Falz, A.-L., Müller-Schüssele, S. J., and Sparkes, I. (2020). It Started With a Kiss: Monitoring Organelle Interactions and Identifying Membrane Contact Site Components in Plants. *Front. Plant Sci.* 11, 517. doi: 10.3389/fpls.2020.00517
17. Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriol. Rev.* 35, 235–241.
18. Baluska, F., Samaj, J., Napier, R., and Volkmann, D. (1999). Maize calreticulin localizes preferentially to plasmodesmata in root apex. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 19, 481–488. doi: 10.1046/j.1365-313x.1999.00530.x
19. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5
20. Bartels, S., and Boller, T. (2015). Quo vadis, Pep? Plant elicitor peptides at the crossroads of immunity, stress, and development. *J. Exp. Bot.* 66, 5183–5193. doi: 10.1093/jxb/erv180
21. Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356–363. doi: 10.1038/nature02874
22. Bayer, E. M., Sparkes, I., Vanneste, S., and Rosado, A. (2017). From shaping organelles to signalling platforms: the emerging functions of plant ER-PM contact sites. *Curr. Opin. Plant Biol.* 40, 89–96. doi: 10.1016/j.pbi.2017.08.006
23. Bègue, H., Mounier, A., Rosnoblet, C., and Wendehenne, D. (2019). Toward the understanding of the role of CDC48, a major component of the protein quality control, in plant immunity. *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.* 279, 34–44. doi: 10.1016/j.plantsci.2018.10.029

24. Bendahmane, A., Kanyuka, K., and Baulcombe, D. C. (1999). The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* 11, 781–792.
25. Bhat, S., Folimonova, S. Y., Cole, A. B., Ballard, K. D., Lei, Z., Watson, B. S., et al. (2013). Influence of host chloroplast proteins on Tobacco mosaic virus accumulation and intercellular movement. *Plant Physiol.* 161, 134–147. doi: 10.1104/pp.112.207860
26. Bhattacharyya, D., and Chakraborty, S. (2018). Chloroplast: the Trojan horse in plant-virus interaction. *Mol. Plant Pathol.* 19, 504–518. doi: 10.1111/mpp.12533
27. Bieri, S., Mauch, S., Shen, Q.-H., Peart, J., Devoto, A., Casais, C., et al. (2004). RAR1 Positively Controls Steady State Levels of Barley MLA Resistance Proteins and Enables Sufficient MLA6 Accumulation for Effective Resistance. *Plant Cell* 16, 3480–3495. doi: 10.1105/tpc.104.026682
28. Bilgin, D. D., Zavala, J. A., Zhu, J., Clough, S. J., Ort, D. R., and DeLUCIA, E. H. (2010). Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant Cell Environ.* 33, 1597–1613. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02167.x
29. Blevins, T., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P. V., Beknazariants, D., Si-Ammour, A., Park, H.-S., et al. (2006). Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Res.* 34, 6233–6246. doi: 10.1093/nar/gkl886
30. Bobik, K., McCray, T. N., Ernest, B., Fernandez, J. C., Howell, K. A., Lane, T., et al. (2017). The chloroplast RNA helicase ISE2 is required for multiple chloroplast RNA processing steps in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 91, 114–131. doi: 10.1111/tbj.13550
31. Bonardi, V., Cherkis, K., Nishimura, M. T., and Dangl, J. L. (2012). A new eye on NLR proteins: focused on clarity or diffused by complexity? *Curr. Opin. Immunol.* 24, 41–50. doi: 10.1016/j.coi.2011.12.006
32. Boutrot, F., and Zipfel, C. (2017). Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55, 257–286. doi: 10.1146/annurev-phyto-080614-120106
33. Boyko, V., Ferralli, J., Ashby, J., Schellenbaum, P., and Heinlein, M. (2000a). Function of microtubules in intercellular transport of plant virus RNA. *Nat. Cell Biol.* 2, 826–832. doi: 10.1038/35041072
34. Boyko, V., Ferralli, J., and Heinlein, M. (2000b). Cell-to-cell movement of TMV RNA is temperature-dependent and corresponds to the association of movement protein with microtubules. *Plant J.* 22, 315–325. doi: 10.1046/j.1365-313x.2000.00740.x
35. Boyko, V., Hu, Q., Seemanpillai, M., Ashby, J., and Heinlein, M. (2007). Validation of microtubule-associated Tobacco mosaic virus RNA movement and involvement of microtubule-aligned particle trafficking. *Plant J.* 51, 589–603. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03163.x
36. Brault, M. L., Petit, J. D., Immel, F., Nicolas, W. J., Glavier, M., Brocard, L., et al. (2019). Multiple C2 domains and transmembrane region proteins (MCTP s) tether membranes at plasmodesmata. *EMBO Rep.* doi: 10.15252/embr.201847182

37. Brill, L. M., Nunn, R. S., Kahn, T. W., Yeager, M., and Beachy, R. N. (2000). Recombinant tobacco mosaic virus movement protein is an RNA-binding, α -helical membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 7112. doi: 10.1073/pnas.130187897
38. Brodersen, P., and Voinnet, O. (2006). The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet. TIG* 22, 268–280. doi: 10.1016/j.tig.2006.03.003
39. Brunkard, J. O., and Burch-Smith, T. M. (2018). Ties that bind: the integration of plastid signalling pathways in plant cell metabolism. *Essays Biochem.* 62, 95–107. doi: 10.1042/EBC20170011
40. Budziszewska, M., and Obrepalska-Stepłowska, A. (2018). The Role of the Chloroplast in the Replication of Positive-Sense Single-Stranded Plant RNA Viruses. *Front. Plant Sci.* 9. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.01776> (Accessed January 31, 2024).
41. Burch-Smith, T. M., Brunkard, J. O., Choi, Y. G., and Zambryski, P. C. (2011). Organelle–nucleus cross-talk regulates plant intercellular communication via plasmodesmata. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, E1451–E1460. doi: 10.1073/pnas.1117226108
42. Burch-Smith, T. M., Cui, Y., and Zambryski, P. C. (2012). Reduced levels of class 1 reversibly glycosylated polypeptide increase intercellular transport via plasmodesmata. *Plant Signal. Behav.* 7, 62–67. doi: 10.4161/psb.7.1.18636
43. Burch-Smith, T. M., and Zambryski, P. C. (2010). Loss of INCREASED SIZE EXCLUSION LIMIT (ISE)1 or ISE2 Increases the Formation of Secondary Plasmodesmata. *Curr. Biol.* 20, 989–993. doi: 10.1016/j.cub.2010.03.064
44. Burch-Smith, T. M., and Zambryski, P. C. (2012). Plasmodesmata paradigm shift: regulation from without versus within. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 239–260. doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105453
45. Burgoyne, T., Patel, S., and Eden, E. R. (2015). Calcium signaling at ER membrane contact sites. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 2012–2017. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.01.022
46. Burgyán, J., and Havelda, Z. (2011). Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci.* 16, 265–272. doi: 10.1016/j.tplants.2011.02.010
47. Burton, R. A., Gibeaut, D. M., Bacic, A., Findlay, K., Roberts, K., Hamilton, A., et al. (2000). Virus-Induced Silencing of a Plant Cellulose Synthase Gene. *Plant Cell* 12, 691–706.
48. Butterbach, P., Verlaan, M. G., Dullemans, A., Lohuis, D., Visser, R. G. F., Bai, Y., et al. (2014). Tomato yellow leaf curl virus resistance by Ty-1 involves increased cytosine methylation of viral genomes and is compromised by cucumber mosaic virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 12942–12947. doi: 10.1073/pnas.1400894111
49. Calil, I. P., and Fontes, E. P. B. (2017). Plant immunity against viruses: antiviral immune receptors in focus. *Ann. Bot.* 119, 711–723. doi: 10.1093/aob/mcw200

50. Camborde, L., Planchais, S., Tournier, V., Jakubiec, A., Drugeon, G., Lacassagne, E., et al. (2010). The Ubiquitin-Proteasome System Regulates the Accumulation of Turnip yellow mosaic virus RNA-Dependent RNA Polymerase during Viral Infection[W]. *Plant Cell* 22, 3142–3152. doi: 10.1105/tpc.109.072090
51. Canto, T., MacFarlane, S. A., and Palukaitis, P. (2004). ORF6 of Tobacco mosaic virus is a determinant of viral pathogenicity in *Nicotiana benthamiana*. *J. Gen. Virol.* 85, 3123–3133. doi: 10.1099/vir.0.80270-0
52. Caplan, J. L., Mamillapalli, P., Burch-Smith, T. M., Czymmek, K., and Dinesh-Kumar, S. P. (2008). Chloroplastic protein NRIP1 mediates innate immune receptor recognition of a viral effector. *Cell* 132, 449–462. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.031
53. Caplan, J. L., Zhu, X., Mamillapalli, P., Marathe, R., Anandalakshmi, R., and Dinesh-Kumar, S. P. (2009). Induced ER-chaperones regulate a novel receptor-like kinase to mediate a viral innate immune response. *Cell Host Microbe* 6, 457–469. doi: 10.1016/j.chom.2009.10.005
54. Carbonell, A., Fahlgren, N., Garcia-Ruiz, H., Gilbert, K. B., Montgomery, T. A., Nguyen, T., et al. (2012). Functional Analysis of Three Arabidopsis ARGONAUTES Using Slicer-Defective Mutants[W][OA]. *Plant Cell* 24, 3613–3629. doi: 10.1105/tpc.112.099945
55. Carr, J. P., Lewsey, M. G., and Palukaitis, P. (2010). Signaling in induced resistance. *Adv. Virus Res.* 76, 57–121. doi: 10.1016/S0065-3527(10)76003-6
56. Castel, S. E., and Martienssen, R. A. (2013). RNA interference (RNAi) in the Nucleus: roles for small RNA in transcription, epigenetics and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 14, 100–112. doi: 10.1038/nrg3355
57. Chapman, S., Kavanagh, T., and Baulcombe, D. (1992). Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 2, 549–557. doi: 10.1046/j.1365-313x.1992.t01-24-00999.x
58. Chen, H.-M., Chen, L.-T., Patel, K., Li, Y.-H., Baulcombe, D. C., and Wu, S.-H. (2010). 22-nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 15269–15274. doi: 10.1073/pnas.1001738107
59. Chen, M. H., Sheng, J., Hind, G., Handa, A. K., and Citovsky, V. (2000). Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *EMBO J.* 19, 913–920. doi: 10.1093/emboj/19.5.913
60. Chen, M.-H., Tian, G.-W., Gafni, Y., and Citovsky, V. (2005). Effects of Calreticulin on Viral Cell-to-Cell Movement. *Plant Physiol.* 138, 1866–1876. doi: 10.1104/pp.105.064386
61. Chen, T., Liu, D., Niu, X., Wang, J., Qian, L., Han, L., et al. (2017). Antiviral Resistance Protein Tm-22 Functions on the Plasma Membrane. *Plant Physiol.* 173, 2399–2410. doi: 10.1104/pp.16.01512

62. Chenon, M., Camborde, L., Cheminant, S., and Jupin, I. (2012). A viral deubiquitylating enzyme targets viral RNA-dependent RNA polymerase and affects viral infectivity. *EMBO J.* 31, 741–753. doi: 10.1038/emboj.2011.424
63. Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J. D. G., et al. (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448, 497–500. doi: 10.1038/nature05999
64. Chisholm, S. T., Mahajan, S. K., Whitham, S. A., Yamamoto, M. L., and Carrington, J. C. (2000). Cloning of the Arabidopsis RTM1 gene, which controls restriction of long-distance movement of tobacco etch virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 489–494.
65. CHIU, M., CHEN, I., BAULCOMBE, D. C., and TSAI, C. (2010). The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Mol. Plant Pathol.* 11, 641–649. doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00634.x
66. Christensen, A., Svensson, K., Thelin, L., Zhang, W., Tintor, N., Prins, D., et al. (2010). Higher Plant Calreticulins Have Acquired Specialized Functions in Arabidopsis. *PLoS ONE* 5, e11342. doi: 10.1371/journal.pone.0011342
67. Christis, C., Lubsen, N. H., and Braakman, I. (2008). Protein folding includes oligomerization - examples from the endoplasmic reticulum and cytosol. *FEBS J.* 275, 4700–4727. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06590.x
68. Citovsky, V. (1999). Tobacco mosaic virus: a pioneer of cell-to-cell movement. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 354, 637–643.
69. Citovsky, V., McLean, B. G., Zupan, J. R., and Zambryski, P. (1993). Phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein by a developmentally regulated plant cell wall-associated protein kinase. *Genes Dev.* 7, 904–910. doi: 10.1101/gad.7.5.904
70. Citovsky, V., Zaltsman, A., Kozlovsky, S. V., Gafni, Y., and Krichevsky, A. (2009). Proteasomal degradation in plant-pathogen interactions. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 1048–1054. doi: 10.1016/j.semcdb.2009.05.012
71. Coll, N. S., Epple, P., and Dangl, J. L. (2011). Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ.* 18, 1247–1256. doi: 10.1038/cdd.2011.37
72. Collier, S. M., and Moffett, P. (2009). NB-LRRs work a “bait and switch” on pathogens. *Trends Plant Sci.* 14, 521–529. doi: 10.1016/j.tplants.2009.08.001
73. Couto, D., and Zipfel, C. (2016). Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 537–552. doi: 10.1038/nri.2016.77
74. Covey, S. N., Al-Kaff, N. S., Lángara, A., and Turner, D. S. (1997). Plants combat infection by gene silencing. *Nature* 385, 781–782. doi: 10.1038/385781a0
75. Crawford, K. M., and Zambryski, P. C. (1999). Phloem transport: Are you chaperoned? *Curr. Biol. CB* 9, R281-285. doi: 10.1016/s0960-9822(99)80179-1
76. Crawford, T., Lehotai, N., and Strand, Å. (2018). The role of retrograde signals during plant stress responses. *J. Exp. Bot.* 69, 2783–2795. doi: 10.1093/jxb/erx481

77. Csorba, T., Bovi, A., Dalmay, T., and Burgyán, J. (2007). The p122 Subunit of Tobacco Mosaic Virus Replicase Is a Potent Silencing Suppressor and Compromises both Small Interfering RNA- and MicroRNA-Mediated Pathways. *J. Virol.* 81, 11768–11780. doi: 10.1128/JVI.01230-07
78. Csorba, T., Kontra, L., and Burgyán, J. (2015). viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology* 479–480, 85–103. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.028
79. Culver, J. N., and Dawson, W. O. (1989). Tobacco mosaic virus coat protein: an elicitor of the hypersensitive reaction but not required for the development of mosaic symptoms in *Nicotiana sylvestris*. *Virology* 173, 755–758. doi: 10.1016/0042-6822(89)90592-8
80. Curin, M., Ojangu, E.-L., Trutnyeva, K., Ilau, B., Truve, E., and Waigmann, E. (2007). MPB2C, a Microtubule-Associated Plant Factor, Is Required for Microtubular Accumulation of Tobacco Mosaic Virus Movement Protein in Plants. *Plant Physiol.* 143, 801–11. doi: 10.1104/pp.106.091488
81. Curtin, S. J., Watson, J. M., Smith, N. A., Eamens, A. L., Blanchard, C. L., and Waterhouse, P. M. (2008). The roles of plant dsRNA-binding proteins in RNAi-like pathways. *FEBS Lett.* 582, 2753–2760. doi: 10.1016/j.febslet.2008.07.004
82. Dalakouras, A., Wassenegger, M., Dadami, E., Ganopoulos, I., Pappas, M. L., and Papadopoulou, K. (2020). Genetically Modified Organism-Free RNA Interference: Exogenous Application of RNA Molecules in Plants1 [OPEN]. *Plant Physiol.* 182, 38–50. doi: 10.1104/pp.19.00570
83. Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K. D., Carrington, J. C., and Voinnet, O. (2006). Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313, 68–71. doi: 10.1126/science.1128214
84. Dhugga, K. S., Tiwari, S. C., and Ray, P. M. (1997). A reversibly glycosylated polypeptide (RGP1) possibly involved in plant cell wall synthesis: purification, gene cloning, and trans-Golgi localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 7679–7684. doi: 10.1073/pnas.94.14.7679
85. Diaz-Pendon, J. A., Li, F., Li, W.-X., and Ding, S.-W. (2007). Suppression of Antiviral Silencing by Cucumber Mosaic Virus 2b Protein in *Arabidopsis* Is Associated with Drastically Reduced Accumulation of Three Classes of Viral Small Interfering RNAs. *Plant Cell* 19, 2053–2063. doi: 10.1105/tpc.106.047449
86. Diaz-Pendon, J. A., Truniger, V., Nieto, C., Garcia-Mas, J., Bendahmane, A., and Aranda, M. A. (2004). Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Mol. Plant Pathol.* 5, 223–233. doi: 10.1111/j.1364-3703.2004.00223.x
87. Ding, S. W., Shi, B. J., Li, W. X., and Symons, R. H. (1996). An interspecies hybrid RNA virus is significantly more virulent than either parental virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 7470–7474.
88. Ding, S.-W., and Voinnet, O. (2007). Antiviral Immunity Directed by Small RNAs. *Cell* 130, 413–426. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.039

89. Ding, X. S., Liu, J., Cheng, N.-H., Folimonov, A., Hou, Y.-M., Bao, Y., et al. (2004). The Tobacco mosaic virus 126-kDa protein associated with virus replication and movement suppresses RNA silencing. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 17, 583–592. doi: 10.1094/MPMI.2004.17.6.583
90. Dodds, P. N., and Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* 11, 539–548. doi: 10.1038/nrg2812
91. Dong, X. (2004). The role of membrane-bound ankyrin-repeat protein ACD6 in programmed cell death and plant defense. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2004, pe6. doi: 10.1126/stke.2212004pe6
92. Dorokhov, I. L., Ivanov, P. A., Novikov, V. K., Yefimov, V. A., and Atabekov, I. G. (1993). [Tobamovirus of cruciferous plants: nucleotide sequence of genes of the transport protein, capsid protein, and 3'-terminal untranslated region]. *Dokl. Akad. Nauk* 332, 518–522.
93. Dorokhov, Y. L., Ershova, N. M., Sheshukova, E. V., and Komarova, T. V. (2019). Plasmodesmata Conductivity Regulation: A Mechanistic Model. *Plants* 8, 595. doi: 10.3390/plants8120595
94. Dorokhov, Y. L., Komarova, T. V., Petrunia, I. V., Frolova, O. Y., Pozdyshev, D. V., and Gleba, Y. Y. (2012). Airborne signals from a wounded leaf facilitate viral spreading and induce antibacterial resistance in neighboring plants. *PLoS Pathog.* 8, e1002640. doi: 10.1371/journal.ppat.1002640
95. Dorokhov, Y. L., Mäkinen, K., Frolova, O. Y., Merits, A., Saarinen, J., Kalkkinen, N., et al. (1999). A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: the host-cell receptor for the tobacco mosaic virus movement protein. *FEBS Lett.* 461, 223–228.
96. Dorokhov, Y. L., Sheshukova, E. V., and Komarova, T. V. (2018). Methanol in Plant Life. *Front. Plant Sci.* 9. doi: 10.3389/fpls.2018.01623
97. Dorokhov YuL, Ivanov, P. A., Novikov, V. K., Agranovsky, A. A., Morozov SYu, Efimov, V. A., et al. (1994). Complete nucleotide sequence and genome organization of a tobamovirus infecting cruciferae plants. *FEBS Lett.* 350, 5–8. doi: 10.1016/0014-5793(94)00721-7
98. Drugeon, G., and Jupin, I. (2002). Stability in vitro of the 69K movement protein of Turnip yellow mosaic virus is regulated by the ubiquitin-mediated proteasome pathway. *J. Gen. Virol.* 83, 3187–3197. doi: 10.1099/0022-1317-83-12-3187
99. Duan, C.-G., Fang, Y.-Y., Zhou, B.-J., Zhao, J.-H., Hou, W.-N., Zhu, H., et al. (2012). Suppression of Arabidopsis ARGONAUTE1-Mediated Slicing, Transgene-Induced RNA Silencing, and DNA Methylation by Distinct Domains of the Cucumber mosaic virus 2b Protein[W]. *Plant Cell* 24, 259–274. doi: 10.1105/tpc.111.092718
100. Eamens, A. L., Wook Kim, K., and Waterhouse, P. M. (2012). DRB2, DRB3 and DRB5 function in a non-canonical microRNA pathway in Arabidopsis thaliana. *Plant Signal. Behav.* 7, 1224–1229. doi: 10.4161/psb.21518

101. Falk, A., Feys, B. J., Frost, L. N., Jones, J. D. G., Daniels, M. J., and Parker, J. E. (1999). EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3292–3297.
102. Fernández de Castro, I., Tenorio, R., and Risco, C. (2016). Virus assembly factories in a lipid world. *Curr. Opin. Virol.* 18, 20–26. doi: 10.1016/j.coviro.2016.02.009
103. Fernandez-Calvino, L., Faulkner, C., Walshaw, J., Saalbach, G., Bayer, E., Benitez-Alfonso, Y., et al. (2011). *Arabidopsis* Plasmodesmal Proteome. *PLoS ONE* 6, e18880. doi: 10.1371/journal.pone.0018880
104. Feys, B. J., Moisan, L. J., Newman, M.-A., and Parker, J. E. (2001). Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *EMBO J.* 20, 5400–5411. doi: 10.1093/emboj/20.19.5400
105. Feys, B. J., Wiermer, M., Bhat, R. A., Moisan, L. J., Medina-Escobar, N., Neu, C., et al. (2005). *Arabidopsis* SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 Stabilizes and Signals within an ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 Complex in Plant Innate Immunity. *Plant Cell* 17, 2601–2613. doi: 10.1105/tpc.105.033910
106. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in. 391.
107. Fitter, D. W., Martin, D. J., Copley, M. J., Scotland, R. W., and Langdale, J. A. (2002). GLK gene pairs regulate chloroplast development in diverse plant species. *Plant J.* 31, 713–727. doi: 10.1046/j.1365-313X.2002.01390.x
108. Fliegmann, J., Mithofer, A., Wanner, G., and Ebel, J. (2004). An ancient enzyme domain hidden in the putative beta-glucan elicitor receptor of soybean may play an active part in the perception of pathogen-associated molecular patterns during broad host resistance. *J. Biol. Chem.* 279, 1132–1140. doi: 10.1074/jbc.M308552200
109. Fraser, R. S. S. (1990). The Genetics of Resistance to Plant Viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 179–200. doi: 10.1146/annurev.py.28.090190.001143
110. Fridborg, I., Grainger, J., Page, A., Coleman, M., Findlay, K., and Angell, S. (2003). TIP, A Novel Host Factor Linking Callose Degradation with the Cell-to-Cell Movement of Potato virus X. *Mol. Plant-Microbe Interactions®* 16, 132–140. doi: 10.1094/MPMI.2003.16.2.132
111. Fujiki, M., Kawakami, S., Kim, R. W., and Beachy, R. N. (2006). Domains of tobacco mosaic virus movement protein essential for its membrane association. *J. Gen. Virol.* 87, 2699–2707. doi: 10.1099/vir.0.81936-0
112. Gaffar, F. Y., and Koch, A. (2019). Catch Me If You Can! RNA Silencing-Based Improvement of Antiviral Plant Immunity. *Viruses* 11, 673. doi: 10.3390/v11070673
113. Gallet, R., Michalakakis, Y., and Blanc, S. (2018). Vector-transmission of plant viruses and constraints imposed by virus–vector interactions. *Curr. Opin. Virol.* 33, 144–150. doi: 10.1016/j.coviro.2018.08.005

114. Ganusova, E. E., Reagan, B. C., Fernandez, J. C., Azim, M. F., Sankoh, A. F., Freeman, K. M., et al. (2020). Chloroplast-to-nucleus retrograde signalling controls intercellular trafficking via plasmodesmata formation. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 375, 20190408. doi: 10.1098/rstb.2019.0408
115. Gao, G., and Luo, H. (2006). The ubiquitin-proteasome pathway in viral infections. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84, 5–14. doi: 10.1139/y05-144
116. Gao, Z., Johansen, E., Eyers, S., Thomas, C. L., Noel Ellis, T. H., and Maule, A. J. (2004). The potyvirus recessive resistance gene, sbm1, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 40, 376–385. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02215.x
117. Garcia, D., Garcia, S., and Voinnet, O. (2014). Nonsense-mediated decay serves as a general viral restriction mechanism in plants. *Cell Host Microbe* 16, 391–402. doi: 10.1016/j.chom.2014.08.001
118. Garcia-Ruiz, H. (2018). Susceptibility Genes to Plant Viruses. *Viruses* 10, 484. doi: 10.3390/v10090484
119. Garcia-Ruiz, H. (2019). Host factors against plant viruses. *Mol. Plant Pathol.* 20, 1588. doi: 10.1111/mpp.12851
120. Garcia-Ruiz, H., Carbonell, A., Hoyer, J. S., Fahlgren, N., Gilbert, K. B., Takeda, A., et al. (2015). Roles and Programming of Arabidopsis ARGONAUTE Proteins during Turnip Mosaic Virus Infection. *PLoS Pathog.* 11, e1004755. doi: 10.1371/journal.ppat.1004755
121. Garcia-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E. J., Sullivan, C. M., Fahlgren, N., Brempelis, K. J., et al. (2010). Arabidopsis RNA-Dependent RNA Polymerases and Dicer-Like Proteins in Antiviral Defense and Small Interfering RNA Biogenesis during Turnip Mosaic Virus Infection[W][OA]. *Plant Cell* 22, 481–496. doi: 10.1105/tpc.109.073056
122. Gazzani, S., Lawrenson, T., Woodward, C., Headon, D., and Sablowski, R. (2004). A link between mRNA turnover and RNA interference in Arabidopsis. *Science* 306, 1046–1048. doi: 10.1126/science.1101092
123. Gillespie, T., Boevink, P., Haupt, S., Roberts, A. G., Toth, R., Valentine, T., et al. (2002). Functional Analysis of a DNA-Shuffled Movement Protein Reveals That Microtubules Are Dispensable for the Cell-to-Cell Movement of Tobacco mosaic virus. *Plant Cell* 14, 1207–1222. doi: 10.1105/tpc.002303
124. Goelet, P., Lomonosoff, G. P., Butler, P. J., Akam, M. E., Gait, M. J., and Karn, J. (1982). Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 5818–5822.
125. Gouguet, P., Gronnier, J., Legrand, A., Perraki, A., Jolivet, M.-D., Deroubaix, A.-F., et al. (2021). Connecting the dots: from nanodomains to physiological functions of REMORINs. *Plant Physiol.* 185, 632–649. doi: 10.1093/plphys/kiab063

126. Gouveia, B. C., Calil, I. P., Machado, J. P. B., Santos, A. A., and Fontes, E. P. B. (2017). Immune Receptors and Co-receptors in Antiviral Innate Immunity in Plants. *Front. Microbiol.* 7, 2139. doi: 10.3389/fmicb.2016.02139
127. Gronnier, J., Crowet, J.-M., Habenstein, B., Nasir, M. N., Bayle, V., Hosy, E., et al. (2017). Structural basis for plant plasma membrane protein dynamics and organization into functional nanodomains. *eLife* 6, e26404. doi: 10.7554/eLife.26404
128. Gushchin, V. A., Lukhovitskaya, N. I., Andreev, D. E., Wright, K. M., Taliansky, M. E., Solovyev, A. G., et al. (2013). Dynamic localization of two tobamovirus ORF6 proteins involves distinct organellar compartments. *J. Gen. Virol.* 94, 230–240. doi: 10.1099/vir.0.045278-0
129. Hamilton, A. J., and Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950–952. doi: 10.1126/science.286.5441.950
130. Han, X., Kumar, D., Chen, H., Wu, S., and Kim, J.-Y. (2014). Transcription factor-mediated cell-to-cell signalling in plants. *J. Exp. Bot.* 65, 1737–1749. doi: 10.1093/jxb/ert422
131. Hao, W., Collier, S. M., Moffett, P., and Chai, J. (2013). Structural Basis for the Interaction between the Potato Virus X Resistance Protein (Rx) and Its Cofactor Ran GTPase-activating Protein 2 (RanGAP2). *J. Biol. Chem.* 288, 35868–35876. doi: 10.1074/jbc.M113.517417
132. Harries, P. A., Park, J.-W., Sasaki, N., Ballard, K. D., Maule, A. J., and Nelson, R. S. (2009). Differing requirements for actin and myosin by plant viruses for sustained intercellular movement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 17594–17599. doi: 10.1073/pnas.0909239106
133. Harvey, J. J. W., Lewsey, M. G., Patel, K., Westwood, J., Heimstädt, S., Carr, J. P., et al. (2011). An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS One* 6, e14639. doi: 10.1371/journal.pone.0014639
134. Hatahet, F., and Ruddock, L. W. (2007). Substrate recognition by the protein disulfide isomerases. *FEBS J.* 274, 5223–5234. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06058.x
135. Heese, A., Hann, D. R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A. M. E., He, K., Li, J., et al. (2007). The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 12217–12222. doi: 10.1073/pnas.0705306104
136. Heinlein, M., Padgett, H. S., Gens, J. S., Pickard, B. G., Casper, S. J., Epel, B. L., et al. (1998). Changing Patterns of Localization of the Tobacco Mosaic Virus Movement Protein and Replicase to the Endoplasmic Reticulum and Microtubules during Infection. *Plant Cell* 10, 1107–1120. doi: 10.1105/tpc.10.7.1107
137. Hiraguri, A., Itoh, R., Kondo, N., Nomura, Y., Aizawa, D., Murai, Y., et al. (2005). Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 57, 173–188. doi: 10.1007/s11103-004-6853-5

138. Hofmann, C., Niehl, A., Sambade, A., Steinmetz, A., and Heinlein, M. (2009). Inhibition of Tobacco Mosaic Virus Movement by Expression of an Actin-Binding Protein. *Plant Physiol.* 149, 1810–1823. doi: 10.1104/pp.108.133827
139. Holmes, F. O. (1929). Local Lesions in Tobacco Mosaic. *Bot. Gaz.* doi: 10.1086/333923
140. Hoser, R., Lichocka, M., Żurczak, M., Hennig, J., and Krzymowska, M. (2014). Emerging role of SGT1 as a regulator of NB-LRR-receptor nucleocytoplasmic partitioning. *Plant Signal. Behav.* 9, e28724. doi: 10.4161/psb.28724
141. Hoser, R., Żurczak, M., Lichocka, M., Zuzga, S., Dadlez, M., Samuel, M. A., et al. (2013). Nucleocytoplasmic partitioning of tobacco N receptor is modulated by SGT1. *New Phytol.* 200, 158–171. doi: 10.1111/nph.12347
142. Hu, P., Ren, Y., Xu, J., Wei, Q., Song, P., Guan, Y., et al. (2022). Identification of ankyrin-transmembrane-type subfamily genes in Triticeae species reveals TaANKTM2A-5 regulates powdery mildew resistance in wheat. *Front. Plant Sci.* 13, 943217. doi: 10.3389/fpls.2022.943217
143. Hua, Z., and Vierstra, R. D. (2011). The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 299–334. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112256
144. Huang, C., Sede, A. R., Elvira-González, L., Yan, Y., Rodriguez, M. E., Mutterer, J., et al. (2023). dsRNA-induced immunity targets plasmodesmata and is suppressed by viral movement proteins. *Plant Cell* 35, 3845–3869. doi: 10.1093/plcell/koad176
145. Huisman, M. J., Linthorst, H. J., Bol, J. F., and Cornelissen, J. C. (1988). The complete nucleotide sequence of potato virus X and its homologies at the amino acid level with various plus-stranded RNA viruses. *J. Gen. Virol.* 69 (Pt 8), 1789–1798. doi: 10.1099/0022-1317-69-8-1789
146. Hyodo, K., and Okuno, T. (2016). Pathogenesis mediated by proviral host factors involved in translation and replication of plant positive-strand RNA viruses. *Curr. Opin. Virol.* 17, 11–18. doi: 10.1016/j.coviro.2015.11.004
147. Inaba, T., and Ito-Inaba, Y. (2010). Versatile roles of plastids in plant growth and development. *Plant Cell Physiol.* 51, 1847–1853. doi: 10.1093/pcp/pcq147
148. Incarbone, M., Zimmermann, A., Hammann, P., Erhardt, M., Michel, F., and Dunoyer, P. (2017). Neutralization of mobile antiviral small RNA through peroxisomal import. *Nat. Plants* 3, 17094. doi: 10.1038/nplants.2017.94
149. Ishibashi, K., and Ishikawa, M. (2013). The Resistance Protein Tm-1 Inhibits Formation of a Tomato Mosaic Virus Replication Protein-Host Membrane Protein Complex. *J. Virol.* 87, 7933–7939. doi: 10.1128/JVI.00743-13
150. Ishibashi, K., and Ishikawa, M. (2014). Mechanisms of tomato mosaic virus RNA replication and its inhibition by the host resistance factor Tm-1. *Curr. Opin. Virol.* 9, 8–13. doi: 10.1016/j.coviro.2014.08.005

151. Ishibashi, K., Masuda, K., Naito, S., Meshi, T., and Ishikawa, M. (2007). An inhibitor of viral RNA replication is encoded by a plant resistance gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 13833–13838. doi: 10.1073/pnas.0703203104
152. Ishikawa, K., Tamura, K., Fukao, Y., and Shimada, T. (2020). Structural and functional relationships between plasmodesmata and plant endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites consisting of three synaptotagmins. *New Phytol.* 226, 798–808. doi: 10.1111/nph.16391
153. Jakubiec, A., Drugeon, G., Camborde, L., and Jupin, I. (2007). Proteolytic Processing of Turnip Yellow Mosaic Virus Replication Proteins and Functional Impact on Infectivity. *J. Virol.* 81, 11402. doi: 10.1128/JVI.01428-07
154. Jakubiec, A., Yang, S. W., and Chua, N.-H. (2012). Arabidopsis DRB4 protein in antiviral defense against Turnip yellow mosaic virus infection. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 69, 14–25. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04765.x
155. Jarsch, I. K., and Ott, T. (2011). Perspectives on remorin proteins, membrane rafts, and their role during plant-microbe interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 24, 7–12. doi: 10.1094/MPMI-07-10-0166
156. Jaubert, M., Bhattacharjee, S., Mello, A. F. S., Perry, K. L., and Moffett, P. (2011). ARGONAUTE2 mediates RNA-silencing antiviral defenses against Potato virus X in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 156, 1556–1564. doi: 10.1104/pp.111.178012
157. Jin, H., Hong, Z., Su, W., and Li, J. (2009). A plant-specific calreticulin is a key retention factor for a defective brassinosteroid receptor in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 13612–13617. doi: 10.1073/pnas.0906144106
158. Jin, H., Li, S., and Villegas, A. (2006). Down-Regulation of the 26S Proteasome Subunit RPN9 Inhibits Viral Systemic Transport and Alters Plant Vascular Development. *Plant Physiol.* 142, 651–661. doi: 10.1104/pp.106.083519
159. Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329. doi: 10.1038/nature05286
160. Ju, H.-J., Ye, C.-M., and Verchot-Lubicz, J. (2008). Mutational analysis of PVX TGBp3 links subcellular accumulation and protein turnover. *Virology* 375, 103–117. doi: 10.1016/j.virol.2008.01.030
161. Kadota, Y., and Shirasu, K. (2012). The HSP90 complex of plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 689–697. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.09.016
162. Kadota, Y., Sklenar, J., Derbyshire, P., Stransfeld, L., Asai, S., Ntoukakis, V., et al. (2014). Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR-associated kinase BIK1 during plant immunity. *Mol. Cell* 54, 43–55. doi: 10.1016/j.molcel.2014.02.021
163. Kakizaki, T., Matsumura, H., Nakayama, K., Che, F.-S., Terauchi, R., and Inaba, T. (2009). Coordination of plastid protein import and nuclear gene expression by plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Plant Physiol.* 151, 1339–1353. doi: 10.1104/pp.109.145987

164. Kamarova, K. A., Ershova, N. M., Sheshukova, E. V., Arifulin, E. A., Ovsianikova, N. L., Antimonova, A. A., et al. (2023). Nicotiana benthamiana Class 1 Reversibly Glycosylated Polypeptides Suppress Tobacco Mosaic Virus Infection. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 12843. doi: 10.3390/ijms241612843
165. Kanyuka, K., Druka, A., Caldwell, D. G., Tymon, A., McCallum, N., Waugh, R., et al. (2005). Evidence that the recessive bymovirus resistance locus rym4 in barley corresponds to the eukaryotic translation initiation factor 4E gene. *Mol. Plant Pathol.* 6, 449–458. doi: 10.1111/j.1364-3703.2005.00294.x
166. Karger, E. M., Frolova, O. Y., Fedorova, N. V., Baratova, L. A., Ovchinnikova, T. V., Susi, P., et al. (2003). Dysfunctionality of a tobacco mosaic virus movement protein mutant mimicking threonine 104 phosphorylation. *J. Gen. Virol.* 84, 727–732. doi: 10.1099/vir.0.18972-0
167. Karpova, O. V., Rodionova, N. P., Ivanov, K. I., Kozlovsky, S. V., Dorokhov, Y. L., and Atabekov, J. G. (1999). Phosphorylation of tobacco mosaic virus movement protein abolishes its translation repressing ability. *Virology* 261, 20–24. doi: 10.1006/viro.1999.9842
168. Kim, D. H., Lee, J.-E., Xu, Z.-Y., Geem, K. R., Kwon, Y., Park, J. W., et al. (2015). Cytosolic targeting factor AKR2A captures chloroplast outer membrane-localized client proteins at the ribosome during translation. *Nat. Commun.* 6, 6843. doi: 10.1038/ncomms7843
169. Kim, D. H., Park, M.-J., Gwon, G. H., Silkov, A., Xu, Z.-Y., Yang, E. C., et al. (2014). An ankyrin repeat domain of AKR2 drives chloroplast targeting through coincident binding of two chloroplast lipids. *Dev. Cell* 30, 598–609. doi: 10.1016/j.devcel.2014.07.026
170. Kim, I., Hempel, F. D., Sha, K., Pfluger, J., and Zambryski, P. C. (2002). Identification of a developmental transition in plasmodesmatal function during embryogenesis in Arabidopsis thaliana. *Dev. Camb. Engl.* 129, 1261–1272. doi: 10.1242/dev.129.5.1261
171. Kitagawa, K., Skowrya, D., Elledge, S. J., Harper, J. W., and Hieter, P. (1999). SGT1 encodes an essential component of the yeast kinetochore assembly pathway and a novel subunit of the SCF ubiquitin ligase complex. *Mol. Cell* 4, 21–33. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80184-7
172. Knox, K., Wang, P., Kriechbaumer, V., Tilsner, J., Frigerio, L., Sparkes, I., et al. (2015). Putting the Squeeze on Plasmodesmata: A Role for Reticulons in Primary Plasmodesmata Formation. *Plant Physiol.* 168, 1563–1572. doi: 10.1104/pp.15.00668
173. Kobayashi, K., Otegui, M. S., Krishnakumar, S., Mindrinos, M., and Zambryski, P. (2007). INCREASED SIZE EXCLUSION LIMIT2 Encodes a Putative DEVH Box RNA Helicase Involved in Plasmodesmata Function during Arabidopsis Embryogenesis. *Plant Cell* 19, 1885–1897. doi: 10.1105/tpc.106.045666
174. Komander, D., Clague, M. J., and Urbé, S. (2009). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 550–563. doi: 10.1038/nrm2731

175. Komarova, T. V., Skulachev, M. V., Zvereva, A. S., Schwartz, A. M., Dorokhov, Y. L., and Atabekov, J. G. (2006). New viral vector for efficient production of target proteins in plants. *Biochem. Biokhimiia* 71, 846–850. doi: 10.1134/s0006297906080049
176. Kørner, C. J., Klauser, D., Niehl, A., Domínguez-Ferreras, A., Chinchilla, D., Boller, T., et al. (2013). The immunity regulator BAK1 contributes to resistance against diverse RNA viruses. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 26, 1271–1280. doi: 10.1094/MPMI-06-13-0179-R
177. Kragler, F., Curin, M., Trutnyeva, K., Gansch, A., and Waigmann, E. (2003). MPB2C, a microtubule-associated plant protein binds to and interferes with cell-to-cell transport of tobacco mosaic virus movement protein. *Plant Physiol.* 132, 1870–1883. doi: 10.1104/pp.103.022269
178. Kriechbaumer, V., Botchway, S. W., Slade, S. E., Knox, K., Frigerio, L., Oparka, K. J., et al. (2015). Reticulomics: Protein-protein interaction studies with two plasmodesmata-localised reticulon family proteins identify binding partners enriched at plasmodesmata, ER and the plasma membrane. *Plant Physiol.*, pp.01153.2015. doi: 10.1104/pp.15.01153
179. Kumar, S., Dubey, A. K., Karmakar, R., Kini, K. R., Mathew, M. K., and Prakash, H. S. (2012). Inhibition of TMV multiplication by siRNA constructs against TOM1 and TOM3 genes of *Capsicum annuum*. *J. Virol. Methods* 186, 78–85. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.07.014
180. Kushwaha, N., Singh, A. K., Basu, S., and Chakraborty, S. (2015). Differential response of diverse solanaceous hosts to tomato leaf curl New Delhi virus infection indicates coordinated action of NBS-LRR and RNAi-mediated host defense. *Arch. Virol.* 160, 1499–1509. doi: 10.1007/s00705-015-2399-x
181. Kuźniak, E., and Kopczewski, T. (2020). The Chloroplast Reactive Oxygen Species-Redox System in Plant Immunity and Disease. *Front. Plant Sci.* 11, 572686. doi: 10.3389/fpls.2020.572686
182. Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E. J., Carrington, J. C., Liu, Y.-P., et al. (2006). Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J.* 25, 2768–2780. doi: 10.1038/sj.emboj.7601164
183. Laliberté, J.-F., and Sanfaçon, H. (2010). Cellular remodeling during plant virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 69–91. doi: 10.1146/annurev-phyto-073009-114239
184. Laliberté, J.-F., and Zheng, H. (2014). Viral Manipulation of Plant Host Membranes. *Annu. Rev. Virol.* 1, 237–259. doi: 10.1146/annurev-virology-031413-085532
185. Lanfermeijer, F. C., Dijkhuis, J., Sturre, M. J. G., de Haan, P., and Hille, J. (2003). Cloning and characterization of the durable tomato mosaic virus resistance gene Tm-2(2) from *Lycopersicon esculentum*. *Plant Mol. Biol.* 52, 1037–1049. doi: 10.1023/a:1025434519282

186. Lanfermeijer, F. C., Warmink, J., and Hille, J. (2005). The products of the broken Tm-2 and the durable Tm-2(2) resistance genes from tomato differ in four amino acids. *J. Exp. Bot.* 56, 2925–2933. doi: 10.1093/jxb/eri288
187. Laporte, C., Vetter, G., Loudes, A.-M., Robinson, D. G., Hillmer, S., Stussi-Garaud, C., et al. (2003). Involvement of the Secretory Pathway and the Cytoskeleton in Intracellular Targeting and Tubule Assembly of Grapevine fanleaf virus Movement Protein in Tobacco BY-2 Cells. *Plant Cell* 15, 2058–2075. doi: 10.1105/tpc.013896
188. Lee, J.-Y., and Lucas, W. J. (2001). Phosphorylation of viral movement proteins – regulation of cell-to-cell trafficking. *Trends Microbiol.* 9, 5–8. doi: 10.1016/S0966-842X(00)01901-6
189. Lee, J.-Y., Taoka, K., Yoo, B.-C., Ben-Nissan, G., Kim, D.-J., and Lucas, W. J. (2005). Plasmodesmal-Associated Protein Kinase in Tobacco and Arabidopsis Recognizes a Subset of Non-Cell-Autonomous Proteins. *Plant Cell* 17, 2817–2831. doi: 10.1105/tpc.105.034330
190. Lee, J.-Y., Yoo, B.-C., Rojas, M. R., Gomez-Ospina, N., Staehelin, L. A., and Lucas, W. J. (2003). Selective trafficking of non-cell-autonomous proteins mediated by NtNCAPP1. *Science* 299, 392–396. doi: 10.1126/science.1077813
191. Lellis, A. D., Kasschau, K. D., Whitham, S. A., and Carrington, J. C. (2002). Loss-of-susceptibility mutants of Arabidopsis thaliana reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Curr. Biol. CB* 12, 1046–1051. doi: 10.1016/s0960-9822(02)00898-9
192. Levy, A. (2015). Turnip vein clearing virus movement protein nuclear activity: Do Tobamovirus movement proteins play a role in immune response suppression? *Plant Signal. Behav.* 10, e1066951. doi: 10.1080/15592324.2015.1066951
193. Levy, A., and Tilsner, J. (2020). Creating Contacts Between Replication and Movement at Plasmodesmata - A Role for Membrane Contact Sites in Plant Virus Infections? *Front. Plant Sci.* 11, 862. doi: 10.3389/fpls.2020.00862
194. Levy, A., Zheng, J., and Lazarowitz, S. (2013). The Tobamovirus Turnip Vein Clearing Virus 30-Kilodalton Movement Protein Localizes to Novel Nuclear Filaments To Enhance Virus Infection. *J. Virol.* 87. doi: 10.1128/JVI.03390-12
195. Levy, A., Zheng, J. Y., and Lazarowitz, S. G. (2015). Synaptotagmin SYTA Forms ER-Plasma Membrane Junctions that Are Recruited to Plasmodesmata for Plant Virus Movement. *Curr. Biol.* 25, 2018–2025. doi: 10.1016/j.cub.2015.06.015
196. Lewis, J. D., and Lazarowitz, S. G. (2010). Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates endocytosis and virus movement protein cell-to-cell transport. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 2491–2496. doi: 10.1073/pnas.0909080107
197. Li, J., Brader, G., and Palva, E. T. (2008). Kunitz trypsin inhibitor: an antagonist of cell death triggered by phytopathogens and fumonisin b1 in Arabidopsis. *Mol. Plant* 1, 482–495. doi: 10.1093/mp/ssn013

198. Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J., and Chen, X. (2005). Methylation Protects miRNAs and siRNAs from a 3'-End Uridylation Activity in Arabidopsis. *Curr. Biol. CB* 15, 1501–1507. doi: 10.1016/j.cub.2005.07.029
199. Li, L., Li, M., Yu, L., Zhou, Z., Liang, X., Liu, Z., et al. (2014). The FLS2-associated kinase BIK1 directly phosphorylates the NADPH oxidase RbohD to control plant immunity. *Cell Host Microbe* 15, 329–338. doi: 10.1016/j.chom.2014.02.009
200. Li, Y., Cui, H., Cui, X., and Wang, A. (2016). The altered photosynthetic machinery during compatible virus infection. *Curr. Opin. Virol.* 17, 19–24. doi: 10.1016/j.coviro.2015.11.002
201. Li, Z., Barajas, D., Panavas, T., Herbst, D. A., and Nagy, P. D. (2008). Cdc34p Ubiquitin-Conjugating Enzyme Is a Component of the Tombusvirus Replicase Complex and Ubiquitinates p33 Replication Protein. *J. Virol.* 82, 6911–6926. doi: 10.1128/JVI.00702-08
202. Lionetti, V., Cervone, F., and Bellincampi, D. (2012). Methyl esterification of pectin plays a role during plant-pathogen interactions and affects plant resistance to diseases. *J. Plant Physiol.* 169, 1623–1630. doi: 10.1016/j.jplph.2012.05.006
203. Lionetti, V., Raiola, A., Cervone, F., and Bellincampi, D. (2014a). How do pectin methylesterases and their inhibitors affect the spreading of tobamovirus? *Plant Signal. Behav.* 9, e972863. doi: 10.4161/15592316.2014.972863
204. Lionetti, V., Raiola, A., Cervone, F., and Bellincampi, D. (2014b). Transgenic expression of pectin methylesterase inhibitors limits tobamovirus spread in tobacco and Arabidopsis. *Mol. Plant Pathol.* 15, 265–274. doi: 10.1111/mpp.12090
205. Liu, C., and Nelson, R. S. (2013). The cell biology of Tobacco mosaic virus replication and movement. *Front. Plant Sci.* 4, 12. doi: 10.3389/fpls.2013.00012
206. Liu, Y., Burch-Smith, T., Schiff, M., Feng, S., and Dinesh-Kumar, S. P. (2004). Molecular chaperone Hsp90 associates with resistance protein N and its signaling proteins SGT1 and Rar1 to modulate an innate immune response in plants. *J. Biol. Chem.* 279, 2101–2108. doi: 10.1074/jbc.M310029200
207. Liu, Y., Huang, C., Zeng, J., Yu, H., Li, Y., and Yuan, C. (2020). Identification of two additional plasmodesmata localization domains in the tobacco mosaic virus cell-to-cell-movement protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 521, 145–151. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.10.093
208. Liu, Y., Ren, D., Pike, S., Pallardy, S., Gassmann, W., and Zhang, S. (2007). Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 51, 941–954. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03191.x
209. Liu, Y., Schiff, M., Serino, G., Deng, X.-W., and Dinesh-Kumar, S. P. (2002). Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the N gene-mediated resistance response to Tobacco mosaic virus. *Plant Cell* 14, 1483–1496. doi: 10.1105/tpc.002493

210. Lucas, W. J., and Lee, J.-Y. (2004). Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 712–726. doi: 10.1038/nrm1470
211. Luo, H. (2016). Interplay between the virus and the ubiquitin–proteasome system: molecular mechanism of viral pathogenesis. *Curr. Opin. Virol.* 17, 1–10. doi: 10.1016/j.coviro.2015.09.005
212. Ma, T., Fu, S., Wang, K., Wang, Y., Wu, J., and Zhou, X. (2022). Palmitoylation Is Indispensable for Remorin to Restrict Tobacco Mosaic Virus Cell-to-Cell Movement in *Nicotiana benthamiana*. *Viruses* 14, 1324. doi: 10.3390/v14061324
213. Machado, J. P. B., Brustolini, O. J. B., Mendes, G. C., Santos, A. A., and Fontes, E. P. B. (2015). NIK1, a host factor specialized in antiviral defense or a novel general regulator of plant immunity? *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 37, 1236–1242. doi: 10.1002/bies.201500066
214. Macho, A. P., and Zipfel, C. (2014). Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling. *Mol. Cell* 54, 263–272. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.028
215. Malpica-López, N., Rajeswaran, R., Beknazariants, D., Seguin, J., Golyaev, V., Farinelli, L., et al. (2018). Revisiting the Roles of Tobamovirus Replicase Complex Proteins in Viral Replication and Silencing Suppression. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 31, 125–144. doi: 10.1094/MPMI-07-17-0164-R
216. Mandadi, K. K., and Scholthof, K.-B. G. (2013). Plant Immune Responses Against Viruses: How Does a Virus Cause Disease? *Plant Cell* 25, 1489–1505. doi: 10.1105/tpc.113.111658
217. Maule Ph.D., A. J., and Palukaitis, P. (1991). Virus movement in infected plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 9, 457–473. doi: 10.1080/07352689109382301
218. McHale, M., Eamens, A. L., Finnegan, E. J., and Waterhouse, P. M. (2013). A 22-nt artificial microRNA mediates widespread RNA silencing in *Arabidopsis*. *Plant J.* 76, 519–529. doi: 10.1111/tpj.12306
219. McLean, B. G., Zupan, J., and Zambryski, P. C. (1995). Tobacco mosaic virus movement protein associates with the cytoskeleton in tobacco cells. *Plant Cell* 7, 2101–2114. doi: 10.1105/tpc.7.12.2101
220. Medina-Puche, L., Tan, H., Dogra, V., Wu, M., Rosas-Diaz, T., Wang, L., et al. (2020). A Defense Pathway Linking Plasma Membrane and Chloroplasts and Co-opted by Pathogens. *Cell* 182, 1109–1124.e25. doi: 10.1016/j.cell.2020.07.020
221. Mestre, P., and Baulcombe, D. C. (2006). Elicitor-Mediated Oligomerization of the Tobacco N Disease Resistance Protein. *Plant Cell* 18, 491–501. doi: 10.1105/tpc.105.037234
222. Micheli, F. (2001). Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends Plant Sci.* 6, 414–419.
223. Miller, S., and Krijnse-Locker, J. (2008). Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 363–374. doi: 10.1038/nrmicro1890

224. Mithöfer, A., Fliegmann, J., Neuhaus-Url, G., Schwarz, H., and Ebel, J. (2000). The hepta-beta-glucoside elicitor-binding proteins from legumes represent a putative receptor family. *Biol. Chem.* 381, 705–713. doi: 10.1515/BC.2000.091
225. Mlotshwa, S., Pruss, G. J., Peragine, A., Endres, M. W., Li, J., Chen, X., et al. (2008). DICER-LIKE2 Plays a Primary Role in Transitive Silencing of Transgenes in Arabidopsis. *PLoS ONE* 3, e1755. doi: 10.1371/journal.pone.0001755
226. Moon, J. Y., and Park, J. M. (2016). Cross-Talk in Viral Defense Signaling in Plants. *Front. Microbiol.* 7, 2068. doi: 10.3389/fmicb.2016.02068
227. Mur, L. A. J., Kenton, P., Lloyd, A. J., Ougham, H., and Prats, E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J. Exp. Bot.* 59, 501–520. doi: 10.1093/jxb/erm239
228. Nagy, P. D., and Lin, W. (2020). Taking over Cellular Energy-Metabolism for TBSV Replication: The High ATP Requirement of an RNA Virus within the Viral Replication Organelle. *Viruses* 12, 56. doi: 10.3390/v12010056
229. Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2, 279–289.
230. Nezames, C. D., and Deng, X. W. (2012). The COP9 Signalosome: Its Regulation of Cullin-Based E3 Ubiquitin Ligases and Role in Photomorphogenesis1. *Plant Physiol.* 160, 38–46. doi: 10.1104/pp.112.198879
231. Nicaise, V., and Candresse, T. (2016). Plum pox virus capsid protein suppresses plant pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity. *Mol. Plant Pathol.* 18, 878–886. doi: 10.1111/mpp.12447
232. Nicaise, V., German-Retana, S., Sanjuán, R., Dubrana, M.-P., Mazier, M., Maisonneuve, B., et al. (2003). The Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Controls Lettuce Susceptibility to the Potyvirus Lettuce mosaic virus. *Plant Physiol.* 132, 1272–1282. doi: 10.1104/pp.102.017855
233. Niehl, A., Amari, K., Gereige, D., Brandner, K., Mély, Y., and Heinlein, M. (2012). Control of Tobacco mosaic virus movement protein fate by CELL-DIVISION-CYCLE protein48. *Plant Physiol.* 160, 2093–2108. doi: 10.1104/pp.112.207399
234. Niehl, A., Amari, K., and Heinlein, M. (2013). CDC48 function during TMV infection: regulation of virus movement and replication by degradation? *Plant Signal. Behav.* 8, e22865. doi: 10.4161/psb.22865
235. Niehl, A., Wyrsh, I., Boller, T., and Heinlein, M. (2016). Double-stranded RNAs induce a pattern-triggered immune signaling pathway in plants. *New Phytol.* 211, 1008–1019. doi: 10.1111/nph.13944
236. Nilsson-Tillgren, T., Kolehmainen-Sevéus, L., and von Wettstein, D. (1969). Studies on the biosynthesis of TMV. *Mol. Gen. Genet. MGG* 104, 124–141. doi: 10.1007/BF00272793

237. Nishikiori, M., Mori, M., Dohi, K., Okamura, H., Katoh, E., Naito, S., et al. (2011). A Host Small GTP-binding Protein ARL8 Plays Crucial Roles in Tobamovirus RNA Replication. *PLoS Pathog.* 7, e1002409. doi: 10.1371/journal.ppat.1002409
238. Nomura, H., Komori, T., Uemura, S., Kanda, Y., Shimotani, K., Nakai, K., et al. (2012). Chloroplast-mediated activation of plant immune signalling in Arabidopsis. *Nat. Commun.* 3, 926. doi: 10.1038/ncomms1926
239. Oparka, K. J., Prior, D. A., Santa Cruz, S., Padgett, H. S., and Beachy, R. N. (1997). Gating of epidermal plasmodesmata is restricted to the leading edge of expanding infection sites of tobacco mosaic virus (TMV). *Plant J. Cell Mol. Biol.* 12, 781–789. doi: 10.1046/j.1365-313x.1997.12040781.x
240. Ouko, M. O., Sambade, A., Brandner, K., Niehl, A., Peña, E., Ahad, A., et al. (2010). Tobacco mutants with reduced microtubule dynamics are less susceptible to TMV. *Plant J.* 62, 829–839. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04195.x
241. Padmanabhan, M. S., Ma, S., Burch-Smith, T. M., Czymmek, K., Huijser, P., and Dinesh-Kumar, S. P. (2013). Novel Positive Regulatory Role for the SPL6 Transcription Factor in the N TIR-NB-LRR Receptor-Mediated Plant Innate Immunity. *PLoS Pathog.* 9, e1003235. doi: 10.1371/journal.ppat.1003235
242. Palukaitis, P., Akbarimotlagh, M., Astaraki, S., Shams-Bakhsh, M., and Yoon, J.-Y. (2024). The Forgotten Tobamovirus Genes Encoding the 54 kDa Protein and the 4-6 kDa Proteins. *Viruses* 16, 1680. doi: 10.3390/v16111680
243. Pankratenko, A. V., Atabekova, A. K., Morozov, S. Y., and Solovyev, A. G. (2020). Membrane Contacts in Plasmodesmata: Structural Components and Their Functions. *Biochem. Mosc.* 85, 531–544. doi: 10.1134/S0006297920050028
244. Peiró, A., Martínez-Gil, L., Tamborero, S., Pallás, V., Sánchez-Navarro, J. A., and Mingarro, I. (2014). The Tobacco mosaic virus movement protein associates with but does not integrate into biological membranes. *J. Virol.* 88, 3016–3026. doi: 10.1128/JVI.03648-13
245. Pelham, J. (1966). Resistance in tomato to tobacco mosaic virus. *Euphytica* 15, 258–267. doi: 10.1007/BF00022331
246. Pelletier, A., and Moffett, P. (2022). N and N'-mediated recognition confers resistance to tomato brown rugose fruit virus. *MicroPublication Biol.* doi: 10.17912/micropub.biology.000660
247. Peña, E. J., and Heinlein, M. (2012). RNA transport during TMV cell-to-cell movement. *Front. Plant Sci.* 3, 193. doi: 10.3389/fpls.2012.00193
248. Perraki, A., Binaghi, M., Mecchia, M. A., Gronnier, J., German-Retana, S., Mongrand, S., et al. (2014). StRemorin1.3 hampers Potato virus X TGBp1 ability to increase plasmodesmata permeability, but does not interfere with its silencing suppressor activity. *FEBS Lett.* 588, 1699–1705. doi: 10.1016/j.febslet.2014.03.014
249. Perraki, A., Gronnier, J., Gouguet, P., Boudsocq, M., Deroubaix, A.-F., Simon, V., et al. (2018). REM1.3's phospho-status defines its plasma membrane nanodomain

- organization and activity in restricting PVX cell-to-cell movement. *PLOS Pathog.* 14, e1007378. doi: 10.1371/journal.ppat.1007378
250. Petit, J. D., Immel, F., Lins, L., and Bayer, E. M. (2019). Lipids or Proteins: Who Is Leading the Dance at Membrane Contact Sites? *Front. Plant Sci.* 10, 198. doi: 10.3389/fpls.2019.00198
251. Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
252. Pfannschmidt, T., Terry, M. J., Van Aken, O., and Quiros, P. M. (2020). Retrograde signals from endosymbiotic organelles: a common control principle in eukaryotic cells. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 375, 20190396. doi: 10.1098/rstb.2019.0396
253. Piron, F., Nicolaï, M., Minoia, S., Piednoir, E., Moretti, A., Salgues, A., et al. (2010). An Induced Mutation in Tomato eIF4E Leads to Immunity to Two Potyviruses. *PLoS ONE* 5, e11313. doi: 10.1371/journal.pone.0011313
254. Prinz, W. A. (2014). Bridging the gap: Membrane contact sites in signaling, metabolism, and organelle dynamics. *J. Cell Biol.* 205, 759–769. doi: 10.1083/jcb.201401126
255. Pruss, G., Ge, X., Shi, X. M., Carrington, J. C., and Bowman Vance, V. (1997). Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 9, 859–868.
256. Qian, L., Zhao, J., Du, Y., Zhao, X., Han, M., and Liu, Y. (2018). Hsp90 Interacts With Tm-22 and Is Essential for Tm-22-Mediated Resistance to Tobacco mosaic virus. *Front. Plant Sci.* 9, 411. doi: 10.3389/fpls.2018.00411
257. Qiao, Y., Li, H. F., Wong, S. M., and Fan, Z. F. (2009). Plastocyanin Transit Peptide Interacts with *Potato virus X* Coat Protein, While Silencing of Plastocyanin Reduces Coat Protein Accumulation in Chloroplasts and Symptom Severity in Host Plants. *Mol. Plant-Microbe Interactions®* 22, 1523–1534. doi: 10.1094/MPMI-22-12-1523
258. Qu, F., Ye, X., and Morris, T. J. (2008). Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14732–14737. doi: 10.1073/pnas.0805760105
259. Raffaele, S., Bayer, E., Lafarge, D., Cluzet, S., German Retana, S., Boubekur, T., et al. (2009). Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. *Plant Cell* 21, 1541–1555. doi: 10.1105/tpc.108.064279
260. Raja, P., Jackel, J. N., Li, S., Heard, I. M., and Bisaro, D. M. (2014). Arabidopsis double-stranded RNA binding protein DRB3 participates in methylation-mediated defense against geminiviruses. *J. Virol.* 88, 2611–2622. doi: 10.1128/JVI.02305-13

261. Raja, P., Sanville, B. C., Buchmann, R. C., and Bisaro, D. M. (2008). Viral Genome Methylation as an Epigenetic Defense against Geminiviruses. *J. Virol.* 82, 8997–9007. doi: 10.1128/JVI.00719-08
262. Rautengarten, C., Birdseye, D., Pattathil, S., McFarlane, H. E., Saez-Aguayo, S., Orellana, A., et al. (2017). The elaborate route for UDP-arabinose delivery into the Golgi of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 4261–4266. doi: 10.1073/pnas.1701894114
263. Reagan, B. C., and Burch-Smith, T. M. (2020). Viruses Reveal the Secrets of Plasmodesmal Cell Biology. *Mol. Plant-Microbe Interactions®* 33, 26–39. doi: 10.1094/MPMI-07-19-0212-FI
264. Reichel, C., and Beachy, R. N. (1998). Tobacco mosaic virus infection induces severe morphological changes of the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 11169–11174.
265. Reichel, C., and Beachy, R. N. (2000). Degradation of Tobacco Mosaic Virus Movement Protein by the 26S Proteasome. *J. Virol.* 74, 3330–3337.
266. Reinero, A., and Beachy, R. N. (1989). Reduced Photosystem II Activity and Accumulation of Viral Coat Protein in Chloroplasts of Leaves Infected with Tobacco Mosaic Virus. *Plant Physiol.* 89, 111–116. doi: 10.1104/pp.89.1.111
267. Rocher, M., Simon, V., Jolivet, M.-D., Sofer, L., Deroubaix, A.-F., Germain, V., et al. (2022). StREM1.3 REMORIN Protein Plays an Agonistic Role in Potyvirus Cell-to-Cell Movement in *N. benthamiana*. *Viruses* 14, 574. doi: 10.3390/v14030574
268. Ross, A. F. (1961). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* 14, 340–358. doi: 10.1016/0042-6822(61)90319-1
269. Roux, M., Schwessinger, B., Albrecht, C., Chinchilla, D., Jones, A., Holton, N., et al. (2011). The Arabidopsis Leucine-Rich Repeat Receptor–Like Kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 Are Required for Innate Immunity to Hemibiotrophic and Biotrophic Pathogens[W]. *Plant Cell* 23, 2440–2455. doi: 10.1105/tpc.111.084301
270. Ruffel, S., Dussault, M.-H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C., et al. (2002). A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J. Cell Mol. Biol.* 32, 1067–1075. doi: 10.1046/j.1365-313x.2002.01499.x
271. Ruggenthaler, P., Fichtenbauer, D., Krasensky, J., Jonak, C., and Waigmann, E. (2009). Microtubule-associated protein AtMPB2C plays a role in organization of cortical microtubules, stomata patterning, and tobamovirus infectivity. *Plant Physiol.* 149, 1354–1365. doi: 10.1104/pp.108.130450
272. Sadanandom, A., Bailey, M., Ewan, R., Lee, J., and Nelis, S. (2012). The ubiquitin-proteasome system: central modifier of plant signalling. *New Phytol.* 196, 13–28. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04266.x
273. Sagi, G., Katz, A., Guenoune-Gelbart, D., and Epel, B. L. (2005). Class 1 reversibly glycosylated polypeptides are plasmodesmal-associated proteins delivered to plasmodesmata via the golgi apparatus. *Plant Cell* 17, 1788–1800. doi: 10.1105/tpc.105.031823

274. Saito, T., Yamanaka, K., Watanabe, Y., Takamatsu, N., Meshi, T., and Okada, Y. (1989). Mutational analysis of the coat protein gene of tobacco mosaic virus in relation to hypersensitive response in tobacco plants with the N' gene. *Virology* 173, 11–20. doi: 10.1016/0042-6822(89)90217-1
275. Sakamoto, T., Deguchi, M., Brustolini, O. J., Santos, A. A., Silva, F. F., and Fontes, E. P. (2012). The tomato RLK superfamily: phylogeny and functional predictions about the role of the LRRII-RLK subfamily in antiviral defense. *BMC Plant Biol.* 12, 229. doi: 10.1186/1471-2229-12-229
276. Saqib, A., Scheller, H. V., Fredslund, F., and Welner, D. H. (2019). Molecular characteristics of plant UDP-arabinopyranose mutases. *Glycobiology* 29, 839–846. doi: 10.1093/glycob/cwz067
277. Sasaki, N., Takashima, E., and Nyunoya, H. (2018). Altered Subcellular Localization of a Tobacco Membrane Raft-Associated Remorin Protein by Tobamovirus Infection and Transient Expression of Viral Replication and Movement Proteins. *Front. Plant Sci.* 9. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2018.00619> (Accessed March 14, 2022).
278. Schapire, A. L., Voigt, B., Jasik, J., Rosado, A., Lopez-Cobollo, R., Menzel, D., et al. (2008). Arabidopsis synaptotagmin 1 is required for the maintenance of plasma membrane integrity and cell viability. *Plant Cell* 20, 3374–3388. doi: 10.1105/tpc.108.063859
279. Schmied, J., Hedtke, B., and Grimm, B. (2011). Overexpression of HEMA1 encoding glutamyl-tRNA reductase. *J. Plant Physiol.* 168, 1372–1379. doi: 10.1016/j.jplph.2010.12.010
280. Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675. doi: 10.1038/nmeth.2089
281. Scholthof, H. B. (2005). Plant virus transport: motions of functional equivalence. *Trends Plant Sci.* 10, 376–382. doi: 10.1016/j.tplants.2005.07.002
282. Scholthof, H. B., Alvarado, V. Y., Vega-Arreguin, J. C., Ciomperlik, J., Odokonyero, D., Brosseau, C., et al. (2011). Identification of an ARGONAUTE for antiviral RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.* 156, 1548–1555. doi: 10.1104/pp.111.178764
283. Schwartz, M., Chen, J., Janda, M., Sullivan, M., den Boon, J., and Ahlquist, P. (2002). A Positive-Strand RNA Virus Replication Complex Parallels Form and Function of Retrovirus Capsids. *Mol. Cell* 9, 505–514. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00474-4
284. Sedbrook, J. C. (2004). MAPs in plant cells: delineating microtubule growth dynamics and organization. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 632–640. doi: 10.1016/j.pbi.2004.09.017
285. Seemanpillai, M., Elamawi, R., Ritzenthaler, C., and Heinlein, M. (2006). Challenging the Role of Microtubules in Tobacco Mosaic Virus Movement by Drug Treatments Is Disputable. *J. Virol.* 80, 6712–6715. doi: 10.1128/JVI.00453-06

286. Sekine, K.-T., Tomita, R., Takeuchi, S., Atsumi, G., Saitoh, H., Mizumoto, H., et al. (2012). Functional differentiation in the leucine-rich repeat domains of closely related plant virus-resistance proteins that recognize common avr proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 25, 1219–1229. doi: 10.1094/MPMI-11-11-0289
287. Selth, L. A., Dogra, S. C., Rasheed, M. S., Randles, J. W., and Rezaian, M. A. (2006). Identification and characterization of a host reversibly glycosylated peptide that interacts with the Tomato leaf curl virus V1 protein. *Plant Mol. Biol.* 61, 297–310. doi: 10.1007/s11103-006-0028-5
288. Serrano, I., Audran, C., and Rivas, S. (2016). Chloroplasts at work during plant innate immunity. *J. Exp. Bot.* 67, 3845–3854. doi: 10.1093/jxb/erw088
289. Sharma, M., and Pandey, G. K. (2015). Expansion and Function of Repeat Domain Proteins During Stress and Development in Plants. *Front. Plant Sci.* 6, 1218. doi: 10.3389/fpls.2015.01218
290. Shen, G., Kuppu, S., Venkataramani, S., Wang, J., Yan, J., Qiu, X., et al. (2010). ANKYRIN REPEAT-CONTAINING PROTEIN 2A is an essential molecular chaperone for peroxisomal membrane-bound ASCORBATE PEROXIDASE3 in Arabidopsis. *Plant Cell* 22, 811–831. doi: 10.1105/tpc.109.065979
291. Sheshukova, E. V., Ershova, N. M., Kamarova, K. A., Dorokhov, Y. L., and Komarova, T. V. (2020). The Tobamoviral Movement Protein: A “Conditioner” to Create a Favorable Environment for Intercellular Spread of Infection. *Front. Plant Sci.* 11, 959. doi: 10.3389/fpls.2020.00959
292. Sheshukova, E. V., Komarova, T. V., Ershova, N. M., Shindyapina, A. V., and Dorokhov, Y. L. (2017). An Alternative Nested Reading Frame May Participate in the Stress-Dependent Expression of a Plant Gene. *Front. Plant Sci.* 8, 2137. doi: 10.3389/fpls.2017.02137
293. Sheshukova, E. V., Komarova, T. V., Pozdyshev, D. V., Ershova, N. M., Shindyapina, A. V., Tashlitsky, V. N., et al. (2017c). The Intergenic Interplay between Aldose 1-Epimerase-Like Protein and Pectin Methyltransferase in Abiotic and Biotic Stress Control. *Front. Plant Sci.* 8. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.01646> (Accessed April 29, 2023).
294. Shimizu, T., Yoshii, A., Sakurai, K., Hamada, K., Yamaji, Y., Suzuki, M., et al. (2009). Identification of a novel tobacco DnaJ-like protein that interacts with the movement protein of tobacco mosaic virus. *Arch. Virol.* 154, 959–967. doi: 10.1007/s00705-009-0397-6
295. Skulachev, M. V., Ivanov, P. A., Karpova, O. V., Korpela, T., Rodionova, N. P., Dorokhov, Y. L., et al. (1999). Internal initiation of translation directed by the 5'-untranslated region of the tobamovirus subgenomic RNA I(2). *Virology* 263, 139–154. doi: 10.1006/viro.1999.9928
296. Slootweg, E., Roosien, J., Spiridon, L. N., Petrescu, A.-J., Tameling, W., Joosten, M., et al. (2010). Nucleocytoplasmic Distribution Is Required for Activation of Resistance by the Potato NB-LRR Receptor Rx1 and Is Balanced by Its Functional Domains[W]. *Plant Cell* 22, 4195–4215. doi: 10.1105/tpc.110.077537

297. Smith, M. H., Ploegh, H. L., and Weissman, J. S. (2011). Road to Ruin: Targeting Proteins for Degradation in the Endoplasmic Reticulum. *Science* 334, 10.1126/science.1209235. doi: 10.1126/science.1209235
298. Sofer, L., Cabanillas, D. G., Gayral, M., Téplier, R., Pouzoulet, J., Ducouso, M., et al. (2017). Identification of host factors potentially involved in RTM-mediated resistance during potyvirus long distance movement. *Arch. Virol.* 162, 1855–1865. doi: 10.1007/s00705-017-3292-6
299. Song, L., Chen, Z., and Larkin, R. M. (2018). The genomes uncoupled Mutants Are More Sensitive to Norflurazon Than Wild Type. *Plant Physiol.* 178, 965–971. doi: 10.1104/pp.18.00982
300. Soosaar, J. L. M., Burch-Smith, T. M., and Dinesh-Kumar, S. P. (2005). Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 789–798. doi: 10.1038/nrmicro1239
301. Souza, P. F. N., Garcia-Ruiz, H., and Carvalho, F. E. L. (2019). What proteomics can reveal about plant–virus interactions? Photosynthesis-related proteins on the spotlight. *Theor. Exp. Plant Physiol.* 31, 227–248. doi: 10.1007/s40626-019-00142-0
302. Su, S., Liu, Z., Chen, C., Zhang, Y., Wang, X., Zhu, L., et al. (2010). Cucumber Mosaic Virus Movement Protein Severs Actin Filaments to Increase the Plasmodesmal Size Exclusion Limit in Tobacco. *Plant Cell* 22, 1373–1387. doi: 10.1105/tpc.108.064212
303. Sulzinski, M. A., Gabard, K. A., Palukaitis, P., and Zaitlin, M. (1985). Replication of tobacco mosaic virus. VIII. Characterization of a third subgenomic TMV RNA. *Virology* 145, 132–140. doi: 10.1016/0042-6822(85)90208-9
304. Sun, Y., Huang, D., and Chen, X. (2019). Dynamic regulation of plasmodesmatal permeability and its application to horticultural research. *Hortic. Res.* 6. doi: 10.1038/s41438-019-0129-3
305. Susek, R. E., Ausubel, F. M., and Chory, J. (1993). Signal transduction mutants of arabidopsis uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell* 74, 787–799. doi: 10.1016/0092-8674(93)90459-4
306. Szittyá, G., and Burgyán, J. (2013). RNA interference-mediated intrinsic antiviral immunity in plants. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 371, 153–181. doi: 10.1007/978-3-642-37765-5_6
307. Tabler, M., and Tsagris, M. (2004). Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. *Trends Plant Sci.* 9, 339–348. doi: 10.1016/j.tplants.2004.05.007
308. Takahashi, A., Casais, C., Ichimura, K., and Shirasu, K. (2003). HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 11777–11782. doi: 10.1073/pnas.2033934100
309. Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M., and Watanabe, Y. (2008). The Mechanism Selecting the Guide Strand from Small RNA Duplexes is Different Among Argoante Proteins. *Plant Cell Physiol.* 49, 493–500. doi: 10.1093/pcp/pcn043

310. Tameling, W. I. L., Nooijen, C., Ludwig, N., Boter, M., Slootweg, E., Goverse, A., et al. (2010). RanGAP2 Mediates Nucleocytoplasmic Partitioning of the NB-LRR Immune Receptor Rx in the Solanaceae, Thereby Dictating Rx Function[W][OA]. *Plant Cell* 22, 4176–4194. doi: 10.1105/tpc.110.077461
311. Tang, D., Wang, G., and Zhou, J.-M. (2017). Receptor Kinases in Plant-Pathogen Interactions: More Than Pattern Recognition[OPEN]. *Plant Cell* 29, 618–637. doi: 10.1105/tpc.16.00891
312. Tettey, C. K., Mu, X.-Q., Ma, H.-Y., Chen, X.-Y., Geng, C., Tian, Y.-P., et al. (2023). The role of different innate and environmental factors in Tm-22-mediated resistance to tomato mottle mosaic virus. *Phytopathol. Res.* 5, 8. doi: 10.1186/s42483-023-00162-4
313. Thelin, L., Mutwil, M., Sommarin, M., and Persson, S. (2011). Diverging functions among calreticulin isoforms in higher plants. *Plant Signal. Behav.* 6, 905–910. doi: 10.4161/psb.6.6.15339
314. Thomas, C. L., Bayer, E. M., Ritzenthaler, C., Fernandez-Calvino, L., and Maule, A. J. (2008). Specific targeting of a plasmodesmal protein affecting cell-to-cell communication. *PLoS Biol.* 6, e7. doi: 10.1371/journal.pbio.0060007
315. Tilsner, J., Amari, K., and Torrance, L. (2011). Plasmodesmata viewed as specialised membrane adhesion sites. *Protoplasma* 248, 39–60. doi: 10.1007/s00709-010-0217-6
316. Tilsner, J., and Kriechbaumer, V. (2022). Reticulons 3 and 6 interact with viral movement proteins. *Mol. Plant Pathol.* 23, 1807. doi: 10.1111/mpp.13261
317. Tilsner, J., Nicolas, W., Rosado, A., and Bayer, E. M. (2016). Staying Tight: Plasmodesmal Membrane Contact Sites and the Control of Cell-to-Cell Connectivity in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67, 337–364. doi: 10.1146/annurev-arplant-043015-111840
318. Tóbiás, I., Rast, A. Th. B., and Maat, D. Z. (1982). Tobamoviruses of pepper, eggplant and tobacco: Comparative host reactions and serological relationships. *Neth. J. Plant Pathol.* 88, 257–268. doi: 10.1007/BF02000131
319. Trutnyeva, K., Bachmaier, R., and Waigmann, E. (2005). Mimicking carboxyterminal phosphorylation differentially effects subcellular distribution and cell-to-cell movement of Tobacco mosaic virus movement protein. *Virology* 332, 563–577. doi: 10.1016/j.virol.2004.11.040
320. Tsujimoto, Y., Numaga, T., Ohshima, K., Yano, M., Ohsawa, R., Goto, D. B., et al. (2003). Arabidopsis TOBAMOVIRUS MULTIPLICATION (TOM) 2 locus encodes a transmembrane protein that interacts with TOM1. *EMBO J.* 22, 335–343. doi: 10.1093/emboj/cdg034
321. Uchiyama, A., Shimada-Beltran, H., Levy, A., Zheng, J. Y., Javia, P. A., and Lazarowitz, S. G. (2014). The Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates the cell-to-cell movement of diverse plant viruses. *Front. Plant Sci.* 5. doi: 10.3389/fpls.2014.00584

322. Ueda, H., Yokota, E., Kutsuna, N., Shimada, T., Tamura, K., Shimmen, T., et al. (2010). Myosin-dependent endoplasmic reticulum motility and F-actin organization in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 6894–6899. doi: 10.1073/pnas.0911482107
323. Ueki, S., Spektor, R., Natale, D. M., and Citovsky, V. (2010). ANK, a Host Cytoplasmic Receptor for the Tobacco mosaic virus Cell-to-Cell Movement Protein, Facilitates Intercellular Transport through Plasmodesmata. *PLOS Pathog.* 6, e1001201. doi: 10.1371/journal.ppat.1001201
324. Van Damme, E. J. M., Lannoo, N., Fouquaert, E., and Peumans, W. J. (2004). The identification of inducible cytoplasmic/nuclear carbohydrate-binding proteins urges to develop novel concepts about the role of plant lectins. *Glycoconj. J.* 20, 449–460. doi: 10.1023/B:GLYC.0000038291.67527.a5
325. Vance, V. B., Berger, P. H., Carrington, J. C., Hunt, A. G., and Shi, X. M. (1995). 5' proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* 206, 583–590. doi: 10.1016/s0042-6822(95)80075-1
326. Várallyay, É., and Havelda, Z. (2013). Unrelated viral suppressors of RNA silencing mediate the control of ARGONAUTE1 level. *Mol. Plant Pathol.* 14, 567–575. doi: 10.1111/mpp.12029
327. Várallyay, É., Válóczy, A., Ágyi, Á., Burgyán, J., and Havelda, Z. (2010). Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *EMBO J.* 29, 3507–3519. doi: 10.1038/emboj.2010.215
328. Vaucheret, H., Béclin, C., and Fagard, M. (2001). Post-transcriptional gene silencing in plants. *J. Cell Sci.* 114, 3083–3091. doi: 10.1242/jcs.114.17.3083
329. Verlaan, M. G., Hutton, S. F., Ibrahim, R. M., Kormelink, R., Visser, R. G. F., Scott, J. W., et al. (2013). The Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Genes Ty-1 and Ty-3 Are Allelic and Code for DFDGD-Class RNA-Dependent RNA Polymerases. *PLoS Genet.* 9, e1003399. doi: 10.1371/journal.pgen.1003399
330. Vogel, F., Hofius, D., and Sonnewald, U. (2007). Intracellular trafficking of Potato leafroll virus movement protein in transgenic Arabidopsis. *Traffic Cph. Den.* 8, 1205–1214. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00608.x
331. Vogler, H., Akbergenov, R., Shivaprasad, P. V., Dang, V., Fasler, M., Kwon, M.-O., et al. (2007). Modification of Small RNAs Associated with Suppression of RNA Silencing by Tobamovirus Replicase Protein. *J. Virol.* 81, 10379–10388. doi: 10.1128/JVI.00727-07
332. Voinnet, O., and Baulcombe, D. C. (1997). Systemic signalling in gene silencing. *Nature* 389, 553–553. doi: 10.1038/39215
333. Waignann, E., Chen, M.-H., Bachmaier, R., Ghoshroy, S., and Citovsky, V. (2000). Regulation of plasmodesmal transport by phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein. *EMBO J.* 19, 4875–4884. doi: 10.1093/emboj/19.18.4875

334. Waigmann, E., Ueki, S., Trutnyeva, K., and Citovsky, V. (2004). The Ins and Outs of Nondestructive Cell-to-Cell and Systemic Movement of Plant Viruses. *Crit. Rev. Plant Sci.* 23, 195–250. doi: 10.1080/07352680490452807
335. Wang, A., and Krishnaswamy, S. (2012). Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. *Mol. Plant Pathol.* 13, 795–803. doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00791.x
336. Wang, D., Weaver, N. D., Kesarwani, M., and Dong, X. (2005). Induction of Protein Secretory Pathway Is Required for Systemic Acquired Resistance. *Science* 308, 1036–1040. doi: 10.1126/science.1108791
337. Wang, H.-L. V., and Chekanova, J. A. (2016). Small RNAs: essential regulators of gene expression and defenses against environmental stresses in plants. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 7, 356–381. doi: 10.1002/wrna.1340
338. Wang, J., Chen, T., Han, M., Qian, L., Li, J., Wu, M., et al. (2020). Plant NLR immune receptor Tm-22 activation requires NB-ARC domain-mediated self-association of CC domain. *PLOS Pathog.* 16, e1008475. doi: 10.1371/journal.ppat.1008475
339. Wang, P., Hawes, C., Richardson, C., and Hussey, P. J. (2018). “Characterization of Proteins Localized to Plant ER-PM Contact Sites,” in *The Plant Endoplasmic Reticulum*, eds. C. Hawes and V. Kriechbaumer (New York, NY: Springer New York), 23–31. doi: 10.1007/978-1-4939-7389-7_3
340. Wang, P., Hawkins, T. J., Richardson, C., Cummins, I., Deeks, M. J., Sparkes, I., et al. (2014a). The Plant Cytoskeleton, NET3C, and VAP27 Mediate the Link between the Plasma Membrane and Endoplasmic Reticulum. *Curr. Biol.* 24, 1397–1405. doi: 10.1016/j.cub.2014.05.003
341. Wang, X., and Mao, T. (2019). Understanding the functions and mechanisms of plant cytoskeleton in response to environmental signals. *Curr. Opin. Plant Biol.* 52, 86–96. doi: 10.1016/j.pbi.2019.08.002
342. Wang, Y., Li, Z., Liu, D., Xu, J., Wei, X., Yan, L., et al. (2014b). Assessment of BAK1 activity in different plant receptor-like kinase complexes by quantitative profiling of phosphorylation patterns. *J. Proteomics* 108, 484–493. doi: 10.1016/j.jprot.2014.06.009
343. Weber, H., and Pfitzner, A. J. (1998). Tm-2(2) resistance in tomato requires recognition of the carboxy terminus of the movement protein of tomato mosaic virus. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 11, 498–503. doi: 10.1094/MPMI.1998.11.6.498
344. Wei, N., and Deng, X. W. (1999). Making sense of the COP9 signalosome. A regulatory protein complex conserved from Arabidopsis to human. *Trends Genet. TIG* 15, 98–103. doi: 10.1016/s0168-9525(98)01670-9
345. Wesley, S. V., Helliwell, C. A., Smith, N. A., Wang, M., Rouse, D. T., Liu, Q., et al. (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* 27, 581–590. doi: 10.1046/j.1365-313X.2001.01105.x

346. Whitham, S., Dinesh-Kumar, S. P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., and Baker, B. (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 78, 1101–1115. doi: 10.1016/0092-8674(94)90283-6
347. Willment, J. A., and Brown, G. D. (2008). C-type lectin receptors in antifungal immunity. *Trends Microbiol.* 16, 27–32. doi: 10.1016/j.tim.2007.10.012
348. Woo, J. Y., Jeong, K. J., Kim, Y. J., and Paek, K.-H. (2016). CaLecRK-S.5, a pepper L-type lectin receptor kinase gene, confers broad-spectrum resistance by activating priming. *J. Exp. Bot.* 67, 5725–5741. doi: 10.1093/jxb/erw336
349. Wright, K. M., Wood, N. T., Roberts, A. G., Chapman, S., Boevink, P., Mackenzie, K. M., et al. (2007). Targeting of TMV movement protein to plasmodesmata requires the actin/ER network: evidence from FRAP. *Traffic Cph. Den.* 8, 21–31. doi: 10.1111/j.1600-0854.2006.00510.x
350. Wu, C.-C., Singh, P., Chen, M.-C., and Zimmerli, L. (2010). L-Glutamine inhibits beta-aminobutyric acid-induced stress resistance and priming in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 61, 995–1002. doi: 10.1093/jxb/erp363
351. Wu, S.-W., Kumar, R., Iswanto, A. B. B., and Kim, J.-Y. (2018). Callose balancing at plasmodesmata. *J. Exp. Bot.* doi: 10.1093/jxb/ery317
352. Wu, X., Valli, A., García, J. A., Zhou, X., and Cheng, X. (2019). The Tug-of-War between Plants and Viruses: Great Progress and Many Remaining Questions. *Viruses* 11, 203. doi: 10.3390/v11030203
353. Xu, X., Jiao, Y., Shen, L., Li, Y., Mei, Y., Yang, W., et al. (2023). Nanoparticle-dsRNA Treatment of Pollen and Root Systems of Diseased Plants Effectively Reduces the Rate of Tobacco Mosaic Virus in Contemporary Seeds. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 15, 29052–29063. doi: 10.1021/acsami.3c02798
354. Yamaji, Y., Maejima, K., Komatsu, K., Shiraiishi, T., Okano, Y., Himeno, M., et al. (2012). Lectin-Mediated Resistance Impairs Plant Virus Infection at the Cellular Level[C][W][OA]. *Plant Cell* 24, 778–793. doi: 10.1105/tpc.111.093658
355. Yamanaka, T., Imai, T., Satoh, R., Kawashima, A., Takahashi, M., Tomita, K., et al. (2002). Complete Inhibition of Tobamovirus Multiplication by Simultaneous Mutations in Two Homologous Host Genes. *J. Virol.* 76, 2491–2497.
356. Yamanaka, T., Ohta, T., Takahashi, M., Meshi, T., Schmidt, R., Dean, C., et al. (2000). TOM1, an Arabidopsis gene required for efficient multiplication of a tobamovirus, encodes a putative transmembrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10107–10112.
357. Yang, H., Gou, X., He, K., Xi, D., Du, J., Lin, H., et al. (2010). BAK1 and BKK1 in Arabidopsis thaliana confer reduced susceptibility to turnip crinkle virus. *Eur. J. Plant Pathol.* 127, 149–156. doi: 10.1007/s10658-010-9581-5
358. Yang, Y. S., and Strittmatter, S. M. (2007). The reticulons: a family of proteins with diverse functions. *Genome Biol.* 8, 234. doi: 10.1186/gb-2007-8-12-234

359. Yang, Y., Zhang, Y., Ding, P., Johnson, K., Li, X., and Zhang, Y. (2012). The ankyrin-repeat transmembrane protein BDA1 functions downstream of the receptor-like protein SNC2 to regulate plant immunity. *Plant Physiol.* 159, 1857–1865. doi: 10.1104/pp.112.197152
360. Ye, C., Dickman, M. B., Whitham, S. A., Payton, M., and Verchot, J. (2011). The Unfolded Protein Response Is Triggered by a Plant Viral Movement Protein1[W][OA]. *Plant Physiol.* 156, 741–755. doi: 10.1104/pp.111.174110
361. Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., et al. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* 5, 730–737. doi: 10.1038/ni1087
362. Yoshii, A., Shimizu, T., Yoshida, A., Hamada, K., Sakurai, K., Yamaji, Y., et al. (2008). NTH201, a Novel Class II KNOTTED1-Like Protein, Facilitates the Cell-to-Cell Movement of Tobacco mosaic virus in Tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interactions®* 21, 586–596. doi: 10.1094/MPMI-21-5-0586
363. Yoshii, M., Nishikiori, M., Tomita, K., Yoshioka, N., Kozuka, R., Naito, S., et al. (2004). The Arabidopsis Cucumovirus Multiplication 1 and 2 Loci Encode Translation Initiation Factors 4E and 4G. *J. Virol.* 78, 6102–6111. doi: 10.1128/JVI.78.12.6102-6111.2004
364. Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R. W., et al. (2005). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* 307, 932–935. doi: 10.1126/science.1107130
365. Yuan, C., Lazarowitz, S. G., and Citovsky, V. (2016). Identification of a Functional Plasmodesmal Localization Signal in a Plant Viral Cell-To-Cell-Movement Protein. *mBio* 7, e02052-02015. doi: 10.1128/mBio.02052-15
366. Yuan, C., Lazarowitz, S. G., and Citovsky, V. (2018). The Plasmodesmal Localization Signal of TMV MP Is Recognized by Plant Synaptotagmin SYTA. *mBio* 9, e01314-18. doi: 10.1128/mBio.01314-18
367. Zanini, A. A., and Burch-Smith, T. M. (2024). New insights into plasmodesmata: complex ‘protoplasmic connecting threads.’ *J. Exp. Bot.* 75, 5557. doi: 10.1093/jxb/erae307
368. Zavaliev, R., and Epel, B. L. (2015). Imaging callose at plasmodesmata using aniline blue: quantitative confocal microscopy. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1217, 105–119. doi: 10.1007/978-1-4939-1523-1_7
369. Zavaliev, R., Sagi, G., Gera, A., and Epel, B. L. (2010). The constitutive expression of Arabidopsis plasmodesmal-associated class 1 reversibly glycosylated polypeptide impairs plant development and virus spread. *J. Exp. Bot.* 61, 131–142. doi: 10.1093/jxb/erp301
370. Zavaliev, R., Ueki, S., Epel, B. L., and Citovsky, V. (2011). Biology of callose (β -1,3-glucan) turnover at plasmodesmata. *Protoplasma* 248, 117–130. doi: 10.1007/s00709-010-0247-0

371. Zhang, H., Li, X., Zhang, Y., Kuppu, S., and Shen, G. (2010). Is AKR2A an essential molecular chaperone for a class of membrane-bound proteins in plants? *Plant Signal. Behav.* 5, 1520–1522. doi: 10.4161/psb.5.11.13714
372. Zhang, H., Zhao, J., Liu, S., Zhang, D.-P., and Liu, Y. (2013). Tm-22 confers different resistance responses against tobacco mosaic virus dependent on its expression level. *Mol. Plant* 6, 971–974. doi: 10.1093/mp/sss153
373. Zhang, X. S., Choi, J. H., Heinz, J., and Chetty, C. S. (2006). Domain-Specific Positive Selection Contributes to the Evolution of Arabidopsis Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinase (LRR RLK) Genes. *J. Mol. Evol.* 63, 612–621. doi: 10.1007/s00239-005-0187-z
374. Zhang, Y., Tian, L., and Lu, C. (2023). Chloroplast gene expression: Recent advances and perspectives. *Plant Commun.* 4, 100611. doi: 10.1016/j.xplc.2023.100611
375. Zhao, J., Liu, Q., Zhang, H., Jia, Q., Hong, Y., and Liu, Y. (2013). The rubisco small subunit is involved in tobamovirus movement and Tm-2²-mediated extreme resistance. *Plant Physiol.* 161, 374–383. doi: 10.1104/pp.112.209213
376. Zhao, J., Zhang, X., Hong, Y., and Liu, Y. (2016). Chloroplast in Plant-Virus Interaction. *Front. Microbiol.* 7. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01565> (Accessed January 30, 2024).
377. Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol.* 35, 345–351. doi: 10.1016/j.it.2014.05.004