

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Уфимский
федеральный исследовательский центр Российской академии наук
(УФИЦ РАН)

Институт биохимии и генетики - обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского
федерального исследовательского центра российской академии наук
(ИБГ УФИЦ РАН)

На правах рукописи

ШЕИН МИХАИЛ ЮРЬЕВИЧ

**РОЛЬ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ В ФОРМИРОВАНИИ ЗАЩИТНЫХ
СИСТЕМ РАСТЕНИЯ ПШЕНИЦЫ ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЯ
СЕПТОРИОЗА *Stagonospora nodorum* BERK**

1.5.7. – Генетика (биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
проф. Максимов И.В.

Уфа – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ	стр.
ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Феномен РНК-интерференции	
1.2 Dicer-подобные белки (DCL)	13
1.3 Белки Аргонавты (AGO)	15
1.4 Передача сигнала РНК-интерференции	17
1.5 Малые РНК	20
1.6 Супрессия активности транскрипции генов хозяина в патогенной системе	21
1.7 Фитогормоны и РНК-интерференция	33
1.8 Хозяин-индуцированное (ХИГС) и спрей-индуцированное (СИГС) подавление активности генов	36
1.9 Симбионты и эндофиты	46
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	49
2.1. Объект исследования	
2.2. Бактерии рода <i>Bacillus</i>	49
2.3 Условия проведения опыта	49
2.4 Методы работы с фитопатогеном	50
2.4.1. Фитопатогенный гриб <i>Stagonospora nodorum</i> Berk	
2.4.2 Инфицирование растений	51
2.4.3 Визуальная оценка степени поражения растений пшеницы	51
2.5 Подбор олигонуклеотидных последовательностей и построение филогенетических деревьев	52
2.6 Молекулярно-биологические методы	55
2.6.1 Выделение и очистка РНК из растений	
2.6.2 Выделение и очистка ДНК из растений	55
2.6.3 Реакция ОТ-ПЦР и полуколичественный анализ экспрессии гена	56
2.6.4 Полимеразная цепная реакция ДНК	57
2.6.5 Электрофоретический анализ формирования ампликонов	57

2.7 Статистическая обработка результатов	58
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	59
3.1. Динамика роста патогенного гриба <i>S. nodorum</i> у контрастных по устойчивости сортов мягкой пшеницы	
3.2 Активность транскрипции генов системы РНКи у растений пшеницы в условиях инфицирования грибом <i>S. nodorum</i> предварительной инокуляции семян салициловой и жасмоновой кислотами	62
3.3 Активность транскрипции генов системы РНКи у растений пшеницы в условиях инфицирования и предварительной инокуляции семян штаммом <i>B. subtilis</i> 26Д	72
3.4 Филогенетический анализ генов <i>TaAGO</i> и <i>TaDCL</i> мягкой пшеницы	76
3.5 Активность транскрипции генов системы РНКи у патогенного гриба <i>S. nodorum</i> в условиях выращивания на питательной среде	96
3.6 Активность транскрипции генов системы РНКи у патогенного гриба <i>S. nodorum</i> в условиях инфицирования растений пшеницы в норме и после предварительной предпосевной обработки семян салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислотами	100
3.7 Активность транскрипции генов системы РНКи у патогенного гриба <i>S. nodorum</i> в условиях инфицирования растений пшеницы в норме и после предпосевной инокуляции семян бактериями <i>B. subtilis</i> 26Д	103
3.8 Филогенетический анализ генов <i>AGO</i> и <i>DCL</i> гриба <i>S. nodorum</i>	105
ОБСУЖДЕНИЕ	109
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	115
ВЫВОДЫ	119
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	121
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	122

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность: Фитопатогены и вызываемые ими болезни наносят огромный ущерб сельскохозяйственным культурам. Наиболее распространенным подходом к защите растений является использование химических пестицидов. Однако, такие средства загрязняют природные экосистемы, способствуют развитию различных заболеваний у человека и приводят к появлению устойчивых к пестицидам более агрессивных форм патогенов. Последнее вынуждает производителей сельскохозяйственной продукции увеличивать дозировку химических средств защиты растений, что еще больше усугубляет экологическую обстановку в агроценозе. В этих условиях перспективными и экологически безопасными способами повышения устойчивости растений является создание новых иммунных сортов и стимулирование естественных фитозащитных механизмов с помощью экзогенных регуляторов и эндофитных микроорганизмов. В связи с этим исследование механизмов формирования защитных реакций растений является актуальной задачей.

Недавно открытое явление РНК-интерференции (РНКи) — это эволюционно сформировавшийся у эукариотических организмов процесс управления активностью генов посредством коротких высококомплементарных РНК и специальных белковых комплексов, приводящий к селективной деградации определенных мРНК или ингибированию трансляции мРНК в клетке на стадии транскрипции, трансляции (Fire et al., 1998). Основными действующими «лицами» РНКи являются малые (короткие) регуляторные РНК (киРНК), формирующиеся из длинных, двухцепочечных РНК (дцРНК). Они разрезаются белками Dicer (в растениях Dicer подобные белки (Dicer Like, DCL) на малые фрагменты и загружаются белками Arganate (AGO) в формирующийся комплекс RISC, который получает таким образом комплементарную целевому фрагменту последовательность. Направление исследований, связанное с оценкой роли компонентов РНК-интерферирующей системы, является одной из наиболее

бурно развивающихся областей молекулярной биологии и геномики в перспективе способствующей не только пониманию механизмов работы генома живых организмов, но и позволяющей использовать полученные знания в практических целях в качестве, например, эффективных защитных спрей-препаратов, отключающих (тормозящих) работу целевых генов патогенов и вредителей на уровне транскрипции и трансляции. Например, в последнее десятилетие РНК-индуцированный сайленсинг генов был использован в качестве эффективного инструмента для создания устойчивых к патогенам растений (Fire et al., 1998). киРНК, в этом случае, выступают в качестве активатора РНК-интерференции и, взаимодействуя с гомологичными последовательностями на целевой мРНК, блокируют их трансляцию. Этот подход открыл новые возможности в развитии эко-технологий для улучшения растений за счет подавления специфических генов, продукты которых сопровождают или, даже, усугубляют развитие стрессового фактора, и, соответственно, повышения экспрессии генов, ответственных за резистентность, а также создания целевых препаратов для защиты растений от конкретных вредных организмов. Механизм явления сайленсинга («косупрессии») экспрессии ряда генов растений при изменении условий существования, в особенности при грибном патогенезе, пока мало известен. Например, при оценке у контрастных по устойчивости к грибу *Verticillium nonalfalfae* сортов хмеля (*Humulus lupulus* L.), обнаружено дифференциальное накопление транскриптов генов, ответственных за РНК-интерференцию, в зависимости от локализации в органах растения (Jeseničnik et al., 2019). Так, в корневой системе устойчивых к грибам растений уровень транскрипта *VnAGO1* был многократно выше, чем в восприимчивых. Напротив, в стеблях транскрипт этого же гена активно накапливался у восприимчивых растений. Кроме того, многократная (30 раз) активация была присуща гену *VnRDR1* в растениях устойчивого сорта *Wye Target*. Важно также заметить, более высокую активность генов, кодирующих ответственные за РНКи белки, проявлял агрессивный штамм гриба. Двойные мутанты *dcl1 dcl2* грибов

Botrytis cinerea (Weiberg et al., 2013) и *Colletotrichum gloeosporioides* (Wang et al., 2018) показали пониженную вирулентность в отношении своих хозяев из-за формирования растением эффективной защитной системы, в том числе и с участием генов *DCL*. Анализ участия компонентов РНК-интерференции в защитных системах растений капусты *Brassica napus* к возбудителю склеротиниоза грибу *Sclerotinia sclerotiorum* показала, что инфицирование приводит к активации гена *BnCAMTA3*, кодирующего кальмодулин-связывающий транскрипционный активатор (Calmodulin-binding transcription activator, CAMTA), взаимодействующего с CGCG боксом промоторов генов *DCL*, *AGO* и *RDR*, чем и объясняется снижение активности транскрипции этих генов (Cao et al., 2016). Обнаружена способность ряда малых РНК гриба *Botrytis cinerea* (Bc-sRNAs) подавлять экспрессию некоторых генов арабидопсиса и томатов, отвечающих за работу РНК-интерферирующей системы (*AGO1*) и иммунитета (Weiberg et al., 2013). С другой стороны, двойное отключение работы грибных генов *BcDCL1* и *BcDCL2*, вызывающее неспособность мутантов продуцировать Bc-sRNAs подавляло его патогенность на растениях (Weiberg et al., 2013). Мутанты арабидопсиса *dcl4*, *ago1*, *ago2*, *ago7*, *ago9*, *rdr1*, *rdr2*, *rdr6*, *sgs1*, *sgs2*, *sgs3* и *nprpd1a* показали большую восприимчивость в отношении грибов *Verticillium dahlia*, *Sclerotinia sclerotiorum* и оомицетов рода *Phytophthora* (Ellendorff et al., 2009; Cao et al., 2016; Guo et al., 2018). Вместе с тем мутанты риса и арабидопсиса, не синтезирующие белок DCL1, проявляли устойчивость к грибам *Magnaporthe oryzae* и *S. sclerotiorum*, соответственно (Zhang et al., 2015; Cao et al., 2016), что можно объяснить необходимостью функционирования именно белков DCL1 в формировании миРНК и последующего запуска явления РНКи, способствующего вирулентности патогенов. Важность белков AGO1 в формировании совместимых отношений подтверждается, кроме того, и тем, что подавление их синтеза повышало устойчивость к грибам *Verticillium dahlia* и *Verticillium longisporum* (Ellendorff et al., 2009; Shen et al., 2014). В геноме растений обнаружены последовательности ДНК, кодирующие мРНК,

формирующие шпилечные конструкции, гомологичные генам синтазы хитина, ответственного за синтез хитина - важного компонента клеточной стенки грибов. Искусственные РНК структуры, содержащие такие гомологии, внедренные в растения, обеспечивали защиту растений от гриба *S. sclerotiorum* (Andrade et al., 2016). Имеются данные о том, что трансгенные растения пшеницы, благодаря процессу РНКи, могут вызывать серьезные дефекты клеточных стенок гифов гриба *Fusarium culmorum*, нарушая синтез хитин-синтазы (Cheng et al., 2015) или β -1, 3-глюкансинтазы (Chen et al., 2016) и демонстрируют повышенную устойчивость. С использованием специфических векторов, содержащих сенс- и антисенс-фрагменты гена патогенной MAP-киназы 1 (Pathogenicity MAP Kinase 1, РМК1) гриба *Rhizoctonia solani*, получены трансгенные растения риса, показавшие снижение степени поражения грибом по технологии, установленной хозяином РНК-интерференции (Host Delivered RNA Interference, HD-RNAi) (Tiwari et al., 2017). Супрессия факторов вирулентности (Ave1, Sge1 и NLP1) гриба *V. dahliae*, посредством хозяин-индуцированного генного замалчивания (Host-induced gene silencing, HIGS), снижала восприимчивость к вертициллезу растений арабидопсиса и томатов (Song, Thomma, 2018). Подобная система хозяин-индуцированного генного замалчивания обнаружена при анализе и других патогенных (Kettles et al., 2019) и симбиотических систем (Silvestri et al., 2019). Однако, о работе системы РНК-интерференции в растениях, инфицированных фитопатогенами, и в особенности грибов-гемибиотрофов, к числу которых относится грибок *Stagonospora nodorum* Berk. - ничего не известно.

Цель исследования: оценить роль генов, кодирующих белки AGO и DCL, компонентов РНКи, в формировании патогенной системы контрастных по устойчивости сортов мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. с возбудителем септориоза *Stagonospora nodorum* Berk.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить роль генов семейств *TaAGO* и *TaDCL* системы РНКи мягкой пшеницы в формировании защитного ответа растения в условиях инфицирования патогеном.
2. Изучить влияние генов семейств *SnAGO* и *SnDCL* системы РНКи патогенного гриба *S. nodorum* Berk. в условиях инфицирования контрастных по устойчивости сортов пшеницы.
3. Оценить влияние предобработки семян мягкой пшеницы салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислотами на активность транскрипции генов системы РНКи у растения-хозяина и патогенного гриба в ходе развития заболевания септориоза.
4. Оценить влияние инокуляции семян мягкой пшеницы бактериальным штаммом *B. subtilis* 26Д на активность транскрипции генов системы РНКи у растения-хозяина и патогенного гриба в ходе развития заболевания септориоза.
5. Провести секвенирование и анализ нуклеотидной последовательности гена, кодирующего белок TaAGO1, у контрастных по устойчивости к возбудителю септориоза сортов мягкой пшеницы.

Научная новизна: Впервые установлено взаимное влияние на активность транскрипции растительных и грибных генов *AGO* и *DCL* системы РНКи в патогенной системе растений пшеницы и возбудителя септориоза *S. nodorum* Berk. Оценено влияние салициловой и жасмоновой кислот на активность генов системы РНКи патогенного гриба в условиях выращивания на питательной среде. Обнаружено воздействие иммунной системы растений пшеницы на активность транскрипции генов *SnAGO1* и *SnAGO2* у патогенного гриба *S. nodorum* с использованием контрастных по устойчивости к патогену сортов пшеницы, а также индукторов фитоиммунитета различной природы, такие как салициловая и жасмоновая кислоты, эндофитных бактерий (*B. subtilis* 26Д). Выявлена взаимосвязь между активностью транскрипции генов *AGO* и *DCL* у растений пшеницы и патогенного гриба *S. nodorum* и

предварительной инокуляцией семян растворами СК, ЖК и бактериальными штаммом *B. subtilis* 26Д в патосистеме. Повышение активности транскрипции генов семейств *AGO* и *DCL* у мягкой пшеницы и снижение активности этих же генов у патогенного гриба в условиях инокуляции растений бактериальным штаммом *B. subtilis* 26Д, предполагает вовлечение эндофита в регуляцию явления РНКи в качестве защитного механизма против патогена. Выявлена важная роль геномной составляющей хромосомы 7D в реализации экспрессии гена *TaAGO1* у растений пшеницы при инфицировании фитопатогенным грибом *S. nodorum*. Секвенирование фрагментов кДНК гена *TaAGO1* у сорта Жница позволило обнаружить замену пролина на серин в аминокислотной последовательности в положении 855 и, соответственно, в изменениях структуры белковой молекулы.

Практическая значимость: Полученные данные позволяют расширить представления о физиологических и биохимических механизмах устойчивости растений. Возможность индуцирования/супрессии экспрессии генов, ответственных за кодирование белков РНКи растения (мягкой пшеницы) или патогена (возбудителя септориоза) за счет обработки растений двуцепочечными РНК и эндофитными штаммами *B. subtilis* может быть использовано при создании биопрепаратов против возбудителя септориоза. Показана возможность диагностики устойчивости растений пшеницы к патогену с использованием соотношения генов домашнего хозяйства партнеров патогенной системы. Это соотношение можно предложить в качестве молекулярного маркера развития гриба в растениях, контрастных по устойчивости к патогену, а также в условиях индуцирования устойчивости различными индукторами фитоиммунитета. Кроме того, полученные результаты могут быть использованы в учебно-исследовательской работе по изучению генетических механизмов регуляции защитных систем при чтении курсов по фитоиммунологии и генетики растений.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на IX Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений – основа

создания растений будущего» (Казань, 2019); 45-й виртуальной (онлайн) конференции FEBS (Любляна, Словения, 2021); на 6-й и 7-й международных научных конференциях «Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений» PlantGen2021 (Новосибирск, 2021) и PlantGen2023 (Казань, 2023); на VII и VIII всероссийской научно-практической конференциях «Биологические и технологические основы селекции, семеноводства, размножения и защиты сельскохозяйственных и лесных древесных растений» (Ялта, 2021, 2022); на VII Всероссийской конференции с конференции с международным участием «ЭКОБИОТЕХ–2021» (Уфа, 2021 г.); на Международных научно-практических конференциях «Современные подходы и методы в защите растений» (Екатеринбург, 2018, 2020); на II и III Международных научных конференциях «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» PLAMIC2020 (Саратов, 2020) и PLAMIC2022 (Санкт-Петербург, 2022); на LI Международной научно-практической конференции «World science: Problems and innovations» (Пенза, 2021).

Конкурсная поддержка. Исследования были поддержаны грантом РФФИ-Аспиранты № 20-34-90004 «Роль РНК-интерференции в формировании защитных систем растения пшеницы против возбудителя септориоза *Stagonospora nodorum* Berk».

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 17 печатных работ, в том числе 6 статей в журналах, входящих в перечень ВАК и индексируемых в международных базах Scopus и Web of Science.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Феномен РНК-интерференции

Явление РНК-интерференции (РНКи) - одно из выдающихся открытий в биологии, документально подтвержденное в 1998 году Эндрю Файром и Крейгом Меллоу на нематодах *Caenorhabditis elegans*, за что они получили Нобелевскую премию (Fire et al., 1998). Вместе с тем, сам феномен РНКи наблюдался еще до его официального признания. Например, подобное явление описывалось под термином «квеллинг» (quelling) с использованием в качестве объекта наблюдений в 1992 г. у гриба *Neurospora crassa* (Romano et al., 1992), в 1997 г – у гриба *Schizophyllum commune* (Schuurs et al., 1997), а в 1998 г – у *Cladosporium fulvum* (Hamada et al., 1998). А еще раньше, в 1990 г., Р. Йоргенсен у трансгенных растений петунии *Petunia hybrid* L., вместо ожидаемо интенсивно фиолетового цвета лепестков, за счет гиперэкспрессии гена халконсинтазы, наблюдал химерные растения с фиолетовыми и белыми, а также полностью белыми цветами.

Функции данного процесса не ограничиваются формированием защитного ответа против патогенов. Данная система играет, также, важную роль в эпигенетической модификации, контроле перемещения мобильных элементов, регуляции стабильности генома, экспрессии генов и образования гетерохроматина, а также в ответных реакциях при воздействии различных стрессовых факторов, к числу которых относятся и патогены различной природы. Система РНКи отличается консервативностью и высокой специфичностью: каждая малая РНК распознает и ингибирует транскрипцию только определенной, целевой последовательности. Явление РНКи играет важную роль в регуляции развития организмов, эпигенетической модификации и в ответных реакциях растений на воздействие различных стрессовых факторов (Lee et al., 2016), к числу которых относятся и фитопаогены (Cai et al., 2018). Фундаментальная защитная роль явления РНКи проявляется главным образом в формировании уникальной естественной защитной стратегии растительного организма против вирусов, патогенов

различной природы и даже насекомых-вредителей и описывается как ХИГС (Maksimov et al., 2019). Однако, поскольку РНКи – продукт коэволюции различных организмов, этот эффективный защитный инструмент может быть успешно преодолен патогенами (Cai et al., 2018).

На рисунке 1 представлено схематическое изображение механизма РНК-интерференции у растений. Установлено, что наряду с малыми РНК (20 - 26 нп), основными компонентами РНКи являются комплексы белков, взаимодействующих с нуклеиновыми кислотами (Yang et al., 2015): РНК-зависимая РНК полимераза (RNA-dependent RNA polymerase (RdR)), Dicer-подобные белки (DCL), белки Аргонавты (AGO) и белки RdDM (РНК-зависимые ДНК-метилазы (RNA-directed DNA metilase) (Максимов и др., 2023).

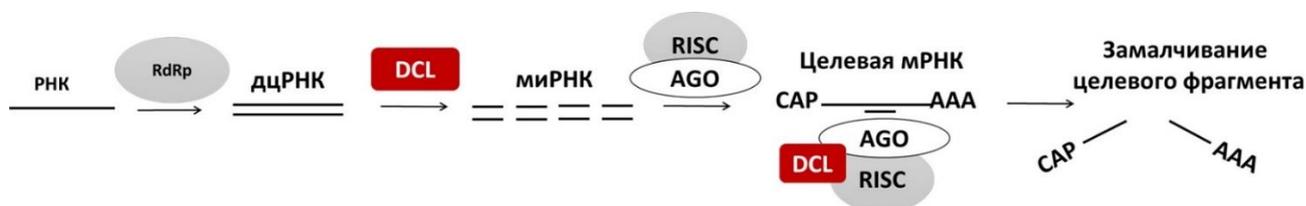


Рисунок 1. Схематическое изображение механизма РНК-интерференции у растений

На начальном этапе целевые дцРНК синтезируются РНК-зависимыми РНК полимеразми (RNA-dependent RNA polymerase, RdR) из исходной одноцепочечной молекулы РНК (вирусная или информационная РНК, транскрибированная с ДНК и кодирующая тот или иной целевой белок, или РНК, транскрибированные с ДНК транспозона и пре-микроРНК, содержащие специфические “шпилечные” структуры). РНК-зависимая РНК-полимераза (RdR) вовлечена в усиление эффекта глушения, реплицируя длинные оцРНК в длинные дцРНК, конвертирующимися, в последствии, белками DCL до киРНК, что приводит к новому циклу глушения РНК. Белок RdR первоначально был идентифицирован как фермент репликации в РНК содержащих вирусах. Активность функционально подобной, но генетически

не гомологичной вирусной к растительной RdR, впервые изучена у китайской капусты в 1971 году (Astier-Manifacier et al., 1971). Наиболее изученными среди растительных RDR белков являются RDR1, RDR2 и RDR6. RDR1, участвуют в амплификации экзогенных фрагментов оцРНК и прайминге фитозащитной системы, а RDR2 - в запуске метиллирования ДНК с участием белков RdDM, необходимом в функционировании РНКи и генерации кРНК. RDR6 активирует метилирование ДНК транскрибируемой области в отсутствие RDR2. В селекции на устойчивость роз к листовым пятнистостям оказался эффективен генный локус, содержащий ген *RDR1* (Terefe-Ayana et al., 2011). Функция RdR в защите растений от вирусов состоит в образовании репликативной вирусной дцРНК, которая, взаимодействуя с белками DCL, индуцирует свою специфическую деградацию (Muhammad et al., 2019).

1.2 Dicer-подобные белки (DCL)

Dicer-подобные белки (DCL) - семейство эндорибонуклеаз РНКазы III, состоящих из геликазы DExD-box-C, домена Piwi-Argonaute-Zwille (PAZ), домена с неизвестной функцией 283 (DUF283), РНКазы III и доменов, связывающих дцРНК (dsRBD). Домен PAZ имеет фосфатсвязывающий карман, состоящий из аргининовых компонентов, распознающих 5'-монофосфат пре-микроРНК и необходимый для ее разрезания на фрагменты коротких дцРНК (Coursey et al., 2018). Белки DCL растений представляют собой многодоменное семейство РНКаз III класса, иницирующих процессинг дцРНК (Rakhshandehroo et al., 2017). Косвенным доказательством участия белков DCL в иммунитете растений и общей физиологии растений может служить их разнообразие, а также нежизнеспособность линий мутантных растений, с отключенным белком DCL1. Считается, что современное разнообразие этой группы белков у растений, включающей четыре белка DCL (*A. thaliana*), возникло в результате необходимости создания систем защиты растений от различных вирусов, патогенов и вредителей (Mukherjee et al., 2018).

Имеются данные о том, что белки DCL участвуют в устойчивости растений к вирусным патогенам, защите от транспозонов, подавлении амплификации вирусов, регуляции экспрессии эндогенных последовательностей, а также репрессии трансгенов (Mukherjee et al., 2013), что позволяет использовать их в трансгенозе с целью обеспечения устойчивости растений к вирусам и вирусным агентам. Показано, что у виноградной лозы *Vitis vinifera* L. гены *VvDCL1* и *VvDCL3* дифференциально и последовательно активируются при грибном патогенезе (Liu et al., 2009). Белок DCL4 вызывал локальную РНК-интерференцию, но для системного развития защитного ответа требовалась комбинация продуктов экспрессии обоих генов DCL2 и DCL4 (Garcia-Ruiz et al., 2015). В тоже время, мутантные по генам *AtDCL2*, *AtDCL3* и *AtDCL4* растения *A. thaliana* не проявляли устойчивость к вирусу огуречной мозаики (ВОМ) и вирусу табачной мозаики (ВТМ) даже при обработке растений СК (Lewsey et al., 2010). Однако, обработка СК растений томатов *S. lycopersicum* и последующее их инфицирование ВТМ способствовало накоплению белков DCL1 и DCL2 (Qi et al., 2021). Подавление экспрессии *NaDCL3*, но не *NaDCL2/4*, усиливало восприимчивость *N. attenuata* к грибу *Fusarium brachygibbosum* (Pradhan et al., 2020). В противовирусной защите растений белки DCL4 опосредуют подавление репликации вирусной РНК (Rakhshandehroo et al., 2017; Jia et al., 2017). Показано, что в ходе эволюции механизмов РНКи происходило усиление сродства к вирусной РНК именно белков DCL4 в сравнении с другими DCL (Jia et al., 2017).

Мутанты по *OsDCL1* риса и *AtDCL1* арабидопсиса проявляли устойчивость, соответственно, к грибам *M. oryzae* и *S. sclerotiorum* (Zhang et al., 2018; Cao et al., 2016), что можно объяснить необходимостью функционирования именно белков DCL1 в формировании микроРНК и последующего запуска РНКи, способствующей вирулентности патогенов (Liu et al., 2005). Соответственно, отключение выработки белков DCL гриба, снижающее генерацию ими малых РНК, ожидаемо должно ослабить

патогенность и рост грибов в растениях. Действительно, двойные мутанты *dcl1/dcl2* грибов *B. cinerea* (Zhang et al., 2022) и *Colletotrichum gloeosporioides* (Wang et al., 2018) показали пониженную вирулентность в отношении своих хозяев. У гриба *Penicillium italicum* вирулентность пропадала при глушении гена *DCL2*, но не *DCL1* (в отличие от *S. sclerotiorum*) (Yin et al., 2020).

1.3 Белки аргонавты (AGO)

Белки аргонавты (AGO) связывают короткие дцРНК, генерированные DCL, и считаются ключевыми в комплексе RISC в путях глушения. Наиболее важная особенность белков AGO - участие в фитоиммунитете. Основная функция белков AGO в растениях – связывание кРНК и микроРНК, генерируемых с участием белков DCL, а также использование этих малых РНК в качестве “направляющих” при узнавании и последующем расщеплении последовательности генов-мишеней на транскрипционном, пост-транскрипционном и трансляционном уровнях.

Наиболее важная функция белков AGO, активно обсуждаемая в научной литературе, это их участие в фитоиммунитете. Белок AGO1 позиционируется как "первый уровень" защиты и подвергается воздействию вирусных супрессоров, а белок AGO2 является следующим уровнем защиты, препятствуя накоплению вирусов и находясь под совместным контролем белка AGO1 и miR403 (Shen et al., 2014). В работе Habig с соавторами (2021) было показано, что AGO1 специфически влияет на способность патогенного гриба *Z. tritici* инфицировать и размножаться по крайней мере у некоторых сортов пшеницы. Функции белка AGO2 могут быть замещены белком AGO5 при нарушении его синтеза. Однако двойной мутант *ago2ago5* был более восприимчив к вирусу, чем мутанты *ago2* или *ago5* по отдельности (Mu et al., 2018). Помимо транскриптов генов *OsAGO1* и *OsAGO3*, в растениях *O. sativa*, зараженных инсективиром, наблюдалось накопление транскриптов гена *OsAGO18*. Предполагается, что кодируемый данным геном белок играет важную роль в устойчивости к вирусам и способствует эффективной

экспрессии гена *OsAGO1* (Zhang et al., 2018). Белок AGO4 является необходимым компонентом РНК-связанного ДНК-метилования при формировании устойчивости *S. lycopersicum* к штамму бактерии *P. siringae* DC3000 (Cao et al., 2016). Выявлено активное участие белков AGO1 и AGO7 в защите турнепса *Brassica rapa subsp. rapifera* от вируса морщинистости листьев (Hou et al., 2019). Важным компонентом, придающим устойчивость к вирусам кольцевой пятнистости (Natarajan et al., 2018), кустистой карликовости (Luan et al., 2018) и мозаики томатов (Yang et al., 2013) в растениях *N. venthamiana* является белок NbAGO2. Выявлена важная роль miR403a в процессе индуцированного СК накопления транскриптов гена *NbAGO2* (Yang et al., 2013). Белки AGO1 формируют совместимость между хозяином и патогеном, что подтверждается, в условиях подавления их синтеза, повышением устойчивости растений к грибам *V. dahlia* и *V. longisporum* (Shen et al., 2014). Обнаружены различия между белками AGO, связанными с транскрипционным глушением генов (transcription gene silencing (TGS)) и посттранскрипционным глушением генов (posttranscription gene silencing (PTGS)). Так, белки AGO4, AGO6 и AGO9 важны при TGS, в то время как AGO1, AGO2, AGO3, AGO5, AGO7 и AGO10 при PTGS (Mallory et al., 2010). Группа белков AGO4 участвует в метиллировании ДНК с участием белков RdDM и связывает дцРНК размером 24 п.н, продуцируемых RdR2 и DCL3 (Matzke et al., 2014; Matzke et al., 2015).

Антивирусные свойства растительных белков AGO представлены в обзорной работе Carbonell и Carrington (2015). Продукты генов *AtAGO1*, *AtAGO2*, и *AtAGO7* *A. thaliana* вовлечены в вирусоустойчивость (Garcia-Ruiz et al., 2015; Alazem et al., 2020). Белки AGO2 *A. thaliana* были более эффективны против X вируса картофеля в сравнении с аналогичным белком из растений *N. Benthamiana* (Brosseau et al., 2020). Кроме того, имеются данные о важности белка AGO4 для устойчивости растений к вирусам. Так мутантные по гену *AGO4* растения оказывались, кроме того, восприимчивыми к вирусу погремковости табака и вирусу скручивания листьев свеклы (Ma et al., 2015).

Аналогично, белок AGO4 оказался важен для формирования защитной системы растений *N. attenuata* против гриба *F. brachygibbosum*, и ингибирование его синтеза нарушало работу жасмонатной сигнальной системы (Pradhan et al., 2020). Было установлено, что это нарушение было связано с остановкой синтеза жасмоновой кислоты (ЖК), и устойчивость к грибу восстанавливалась при обработке растения ЖК. Известно и то, что белки AGO активно задействованы в физиологических процессах происходящих в организме различных видов грибов. Так, гены грибов были идентифицированы в геноме *Fusarium graminearum* (*FgAGO1*) (Chen et al., 2015) и *Metarhizium robertsii* (*MrAgo1*) (Meng et al., 2017). На примере грибов *V. dahlia* и *V. longisporum* показано участие белков грибов семейства AGO в формировании совместимости между хозяином и патогеном (Shen et al., 2014). Аналогичный эффект наблюдался и у гриба *Sclerotinia sclerotiorum* (Neupane et al., 2019). Мутанты по гену *AGO2* имели замедленный рост и пониженную вирулентность (Neupane et al., 2019). Подавление экспрессии гена *AGO2* снижало вирулентность у грибов *Valsa mali* (Feng et al., 2017) и *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* (Jo et al., 2018).

1.4 Передача сигнала РНК-интерференции

Известно об огромном числе РНК, перемещающихся по клеткам и тканям растения (Yang et al., 2015; Nunes et al., 2012). У арабидопсиса описано более 3500 фрагментов РНК, способных к перемещению (Lewsey et al., 2016). Присутствие РНК в соке флоэмы ясно демонстрирует, что они мобильны и, таким образом, участвуют в передаче сигналов на большие расстояния. Хорошо изученными мобильными РНК, перемещающимися от одной клетки к другой, являются мРНК фактора транскрипции *KNOTTED1*, мРНК переносчика сахарозы *SUC1*, а также *miR390* и *miR165/166*. Наблюдали прохождение мРНК просистемина томатов через флоэму и ее выгрузку в клетки привоя, где она транслировалась в ответ на атаку патогенов и придавала устойчивость к ним (Zhang et al., 2018).

В рамках рассмотрения вопроса об участии малых РНК во взаимодействии между хозяином и патогеном необходимо обратить особое внимание на внеклеточные везикулы, вырабатываемые обоими партнерами. Везикулярный обмен РНК между растениями и патогенами описывается как двунаправленная кросс-междарственная РНКи, что в условиях инфицирования может способствовать как иммуностимулирующим, так и иммуносупрессивным процессам (Wang et al., 2019). Внеклеточные везикулы описаны у различных штаммов грибов, и они выполняют функции доставки факторов вирулентности, ремоделирования клеточной стенки и взаимодействия между патогеном и хозяином (Fang et al., 2022). Точно также растения *A. thaliana* секретируют во внеклеточную среду TAS1c-siR483 и TAS2-siR45, в составе везикулярных пузырьков, направляющихся в места инфицирования, которые поглощаются клетками гриба *B. cinerea* и подавляют экспрессию мРНК *Bc-Vps51*, *Bc-DCTN1* и *Bc-SAC1*, снижая таким образом вирулентность гриба (Terefe-Ayana et al., 2011). Подобный механизм глушения патогенных генов обнаружен у подсолнечника, томатов и оливы, что указывает на то, что точный междарственный транспорт растительной дцРНК опосредуется внеклеточными везикулами (De Palma et al., 2020). Растения хлопчатника индуцируют биогенез двух специфических miR166 и miR159 при заражении возбудителем вертициллеза *V. dahliae* и экспортируют их в клетки мицелия гриба для подавления работы генов Ca²⁺-зависимой цистеиновой протеазы (Clp-1) и гидроксилазы изотриходермина C-15 (HiC-15), связанных с вирулентностью, и обеспечивают таким образом устойчивость к болезням (Zhang et al., 2016 (B)). Особо следует отметить, что секреция во внеклеточную среду малых РНК в экзосомах не только усиливается во время стрессового воздействия, но и способствует укреплению врожденного фитоиммунитета (Rutter et al., 2017). Так, транспорт малых РНК из клеток хозяина в мицелий патогена наблюдали в системе пшеница – гриб *F. graminearum*, где хозяйская miR1023 подавляла инвазию гриба, глуша ген *FGSG_03101*, кодирующий альфа/бета-гидролазы (Jiao et al., 2018). И напротив, используя экзосомы, гриб

B. cinerea доставлял свои белки-эффекторы в клетки-хозяина и снижал эффективность работы хозяйского РНКи (Wang et al., 2016). О возможности отключения фитоиммунитета через явление кросс-межцарственной РНКи говорят факты обнаружения в растениях томата, инфицированных грибом *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, Fol - miR1, генерируемой им и комплементарной к фрагменту растительного гена *Solyc06g007430*, кодирующего протеинкиназу SlyFRG4 (Ji et al., 2021). Для эффективного отключения трансляции мРНК *Solyc06g007430* оказалась необходима загрузка Fol - miR1 в комплекс RISC, содержащий белок SlyAGO4a, а отключение накопления этого белка методом VIGS приводила к пониженной восприимчивости к грибу (Ji et al., 2021).

Исходя из возможности дцРНК транспортироваться по растению, можно полагать, что эффективная доставка дцРНК к месту локализации патогена имеет решающее значение для контроля инфицирования патогенами и наоборот (Wytinck et al., 2020). Например, показан перенос ряда малых РНК из клеток арабидопсиса в клетки гриба *B. cinerea* через внеклеточные везикулы, подавляя гены вирулентности грибов и способствуя повышению иммунитета хозяина (Melnyk et al., 2011). Выдвигается предположение, что экзосомы, защищают малые РНК от атаки нуклеаз в апопласте, что объясняет их стабильность и активность после переноса и существование опосредованного экзосомами обмена дцРНК в патогенной системе (Wang et al., 2020). Взятые вместе, комбинация трех возможных транспортных систем для РНК (плазмодесмы, экзосомы и сосудистая транспортная система) позволяет распределять дцРНК по всему организму и даже за его пределами. В растениях секреция везикул происходит не только при инфицировании, но и при абиотических стрессовых воздействиях, фитогормональном воздействии, предполагая врожденный характер работы РНКи на внешние воздействия (Liu et al., 2021).

1.5 Малые РНК

Самыми главными компонентами механизма глушения трансляции генов в растениях, без которых вся описанная выше защитная система не работает, являются малые некодирующие РНК, которые в растениях представлены 3-мя классами: а) 21–22 нт короткие (малые) интерферирующие РНК (siRNA, small interfering RNA); б) 20–24 нт микро РНК (miRNA, micro RNA); в) 24 нт ассоциированные с повторами киРНК (rasiRNA, repeat-associated siRNA) (Leonetti et al., 2020). Комплементарные цепи дцРНК, взаимодействующие с RISC или RITS (киРНК и микро РНК), являются основными компонентами, связывающимися с РНК-мишенью и нарушающими ее функционирование посредством разрыва цепи мРНК или ингибирования ее трансляции.

Хотя биосинтез многих малых РНК детально расшифрован и охарактеризован, основное внимание исследователей, как правило, сосредоточено на микроРНК, которые накапливаются в растениях в ответ на стрессовые воздействия окружающей среды, в том числе абиотические стрессоры. Считается, что микро РНК является важным компонентом, вовлеченным в хозяин-индуцированный генный сайленсинг (ХИГС, host-induced gene silencing (HIGS)) (Qi et al., 2018). Среди них специфическую роль в формировании иммунитета растений против патогенов различной этиологии играют изменения уровней miR160a, miR396a, miR398b, miR482, miR1444, miR2118 и miR7695, которые являются мишенями сигнальных РНК, отвечающих за синтез факторов транскрипции, рецепторных белков NB-LRR, белков системы РНК-интерференции и ферментов про/антиоксидантной системы, регулирующих уровень активных форм кислорода (de Vries et al., 2015; Huang et al., 2019). Выработка miR159 и miR166, а также их транспортировка в клетки фитопатогена *Verticillium dahliae* в растениях хлопчатника в ответ на инфицирование коррелировали с формированием у растений устойчивости к данному грибу (Zhang et al., 2016 (B)). Имеющая гомологию с участком гена, кодирующего транскрипционный фактор

AP2/ERF, miR172 была идентифицирована как регулятор устойчивости растений томатов к оомицету *Phitophthora infestans* (Luan et al., 2018). Аналогичным образом, растения *A. thaliana* выделяют кРНК во внеклеточную среду в составе везикул, которые мигрируют к месту инфекции и подавляют экспрессию генов вирулентности гриба *Botrytis cinerea* (Cai et al., 2018). Подобная секреция внеклеточных везикул у растений происходит не только в ответ на инфекцию, но и под действием фитогормонов, а также абиотических стрессов, что свидетельствует о врожденности феномена РНКи к внешним воздействиям. Поэтому такой транспорт РНКи в экзосомах может быть использован в будущем для разработки методов доставки кРНК и микроРНК в очаг инфекции.

Показана важная роль как сенс-, так и антисенс-последовательностей miR393b в регуляции экспрессии белка MEMB12 из семейства SNARE и, соответственно, устойчивости растений *A. thaliana* к бактерии *P. syringae pv. tomato*.

Подавление синтеза белка MEMB12 в мутантных растениях, накапливающих miR393* и ген *AGO2*, индуцирует экзоцитоз белков PR1. Комплементарная цепь miR393 также вносит свой вклад в антибактериальные реакции, взаимодействуя с белком AGO1 (Zhang et al., 2011). MiR393 подавляет экспрессию мРНК, кодирующих F-box ауксиновые рецепторы TIR1, AFB2 и AFB3, обычно способствующих экспрессии генов ауксинового ответа. Полученные на паре комплементарных фрагментов miRNA*/miRNA и белков AGO1 и AGO2 результаты наглядно продемонстрировали эффективность функционирования иммунитета растений на базе РНК-интерференции (Zhang et al., 2011).

1.6 Супрессия активности транскрипции генов хозяина в патогенной системе

Как и все защитные системы, явление РНКи не безупречно. Оно может успешно преодолеваться патогенами, в том числе и вирусами, поскольку

является продуктом совместного эволюционного развития растения-хозяина и его паразитов (Nunes et al., 2012). Данное противодействие является примером сложной и напряженной эволюционной борьбы между вирусами, фитопатогенами и фитофагами, с одной стороны, и растениями, с другой. Коэволюция супрессоров и компонентов феномена РНКи в растениях иллюстрирует чрезвычайную сложность адаптации мутуалистов, симбиотрофов и патогенов к системе защиты растений. Поскольку генетическая организация, клеточная структура и многие метаболические пути клеток грибов сходны с таковыми у других высших эукариот, очевидно, что эта группа организмов также может использовать РНКи для собственной защиты от других патогенов (Максимов и др., 2021). Однако также очевидно, что этот эффективный механизм РНКи может работать и для преодоления патогенами защиты растения-хозяина (Villalobos-Escobedo et al., 2016). Подробно о супрессорной активности ряда белков, закодированных в геноме вирусов, описано в обзорных работах (Leonetti et al., 2020; Omarov et al., 2010). Этот феномен получил название “вирус-индуцированное подавление экспрессии генов” (virus-induced gene silencing, VIGS) (Lange et al., 2013), как противодействие ХИГС.

Белок HC-Pro (helper component-proteinase) – первый открытый VSR, кодируемый вирусами семейства *Potyviridae*, эффективно подавляющих защитные реакции и способствующие увеличению титра ВТМ и ВОМ, что доказано на трансгенных растениях табака, синтезирующих этот белок. В инфицированных вирусом растениях *S. tuberosum* белок HC-Pro формировал стабильный комплекс с ферментами метионинового цикла S-аденозил-L метионин синтетазой 1 (S-adenosyl-L-methionine synthetase) и S-аденозил- L гомоцистеин гидролазой (S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase), рибосомальными белками и вирусными белком VPg-Pro, а также ключевым белком РНКи – AGO1 (Ivanov et al., 2016). Белок HC-Pro проявил себя как негативный регулятор салицилат-зависимой защитной системы растений, непосредственно взаимодействуя, например, с белком SABP3 (Poque et al.,

2018). Мутация по гену HC-Pro у YVK возвращала устойчивость образцов картофеля *S. tuberosum*, имеющих ген *Ny* (Tian et al., 2013). Точно так же белок С4 вируса курчавости листьев хлопчатника взаимодействовал с S-аденозил-L-метионин синтетазой 1 *N. benthamiana*, ингибируя таким образом его ферментативную активность. На мутантных растениях табака с подавленной активностью гена, кодирующего S-аденозил-L-метионин синтетазу 1, стимулировалось развитие вирусов курчавости листьев хлопчатника и желтой курчавости листьев томата (Ismayil et al., 2018). Известно, что белки 2b ВОМ, Р0 вируса скручивания листьев картофеля, Р38 оболочки вируса морщинистости листьев турнепса и Р1 вируса крапчатости листьев батата нарушали работу белков семейства AGO, ингибируя таким образом работу комплекса RISC (Ivanov et al., 2016). Белок 2b ВОМ активно вовлекается в систему регуляции защитных систем растений. Хотя этот вирусный белок и индуцирует накопление в инфицированных растениях и СК и ЖК, он замалчивает развитие системной устойчивости как по салицилат-, так и жасмонат-индуцируемым путям (Westwood et al., 2013). Точно так же, с использованием трансгенных растений *A. thaliana* с гиперсинтезом белка 2b показано, что этот белок нарушает работу сигнальной антистрессовой программы, индуцируемой и АБК (Westwood et al., 2013). Можно предположить, что такой эффект белка 2b ВОМ согласуется с установившемся убеждением, что индуцируемые СК, ЖК и АБК сигнальные пути в растениях взаимно интерферируют друг друга. Кроме того, было установлено, что ингибирование жасмонатной сигнальной системы белком 2b происходит посредством его взаимодействия с белком JAZ, который повышает привлекательность хозяина для насекомых (Wu et al., 2020). Кодированный вирусом западной желтухи свеклы белок Р0 взаимодействует с гомологом S-фазной киназы (SKP) – компонентом SCF семейства убиквитин Е3 лигазы. Показано, что F-box SKP взаимодействует с доменом PAZ белка AGO1 и подготавливает его к деградации, а выключение экспрессии гена SKP формирует устойчивость к вирусам (Burguan et al., 2011). Гипернакопление

белка P0 в трансформированных растениях *A. thaliana* нарушало развитие растений и повышало уровень киРНК целевых транскриптов, указывая на то, что белок P0 действует на уровне RISC. Способность P0 вызывать деградацию AGO1 – наглядный пример вирусной адаптации к защитному механизму РНКи. Обнаружено, что белок P0, экспрессирующийся в растениях *S. tuberosum*, инфицированных вирусом скручивания листьев картофеля, вызывает подавление РНКи не только у растений, но и у персиковой тли, переносящей этот вирус. В этой связи было высказано предположение, что механизм сайленсинга этой защитной системы сходен у растений и вредителей (Pinheiro et al., 2019). Белок P6, кодируемый вирусом мозаики цветной капусты и требующий для трансляции 35S РНК, подавлял защитную реакцию растений *A. thaliana* при совместном инфицировании вирусом и патогенной бактерией *P. syringae* pv. *tomato*, заглушая окислительный взрыв и снижая уровень СК, что проявляется в зависимой от салицилатов аутофагии (Zvereva et al., 2016). Кроме того, обнаружено, что супрессорный эффект белка P6 отражался на всей системе как салицилат-, так и жасмонат-индуцируемой защитных систем, влияя на их ключевой сигнальный белок NPR1 и повышая восприимчивость к биотрофным бактериям. При этом трансгенные растения, экспрессирующие белок P6, характеризовались большей устойчивостью к жасмонат-чувствительным патогенам и восприимчивостью к салицилат-чувствительным (Love et al., 2012). Белок P19 вируса кустистой карликовости томатов из семейства *Tombusviridae*, участвующий в процессах репродукции, движения, упаковки РНК и векторной трансмиссии вируса, подавлял защитные реакции в растениях табака *N. benthamiana*. Было показано, что этот белок крайне необходим для проникновения и распространения вируса в растениях перца (*Capsicum annuum*) и шпината (*Spinacia oleracea*). Формирование комплекса между димерами P19 и дц киРНК как *in vivo*, так и *in vitro*, коррелировало с амплитудой симптомов вирусного заболевания в растениях (Sutula et al., 2017). Таким образом, функция белка P19 заключается в связывании с вирусными киРНК, циркулирующими в большом количестве во время инфекции, что

делает белковый комплекс RISC недоступным и препятствует процессу защитного метилирования кРНК. Есть основание предполагать, что такое влияние P19 на кРНК может быть связано с его способностью препятствовать работе ответственного за метилирование фермента HEN1. Например, инактивация гена *P19* приводила к полной деградации вирусной РНК и невозможности синтеза вирусных белков. Точно так же, предварительная обработка растений табака кРНК, эффективно взаимодействующих с белком P19, формировала защиту от вируса кустистой карликовости томатов (Sutula et al., 2017).

Белок P21 (21 кДа) вируса желтухи свеклы подавляет РНК индуцированное ингибирование экспрессии белка GFP. В инфицированных вирусом растениях свеклы *Beta vulgaris subsp. vulgaris* белок P21 обнаруживается в клетке в качестве растворимого белка цитоплазмы, а также в форме нерастворимых белковых тел на периферии клетки. Другой гомолог белка P21 вируса цитрусовых тристеза супрессирует РНКи на внутриклеточном и межклеточном уровнях (Scholthof et al., 2007), взаимодействуя с дцРНК и кРНК *in vivo*, препятствуя процессу их метилирования, но не воздействуя при этом на активность комплекса RISC. Кроме того, обнаружено, что в геноме вируса цитрусовых тристеза обнаружены короткие не кодирующиеся РНК (low-molecularweight tristeza 1, LMT1), от наличия которых зависела его вирулентность в отношении растений табака *N. benthamiana*, проявляющаяся в резком снижении уровня СК в инфицированных растениях и активации альтернативной оксидазы, подавляющей окислительный взрыв (Kang et al., 2021). Белок P38 (CP/p38) оболочки вируса морщинистости листьев турнепса отвечает за системное распространение и межклеточное движение вируса. Этот белок является мощным ингибитором РНКи, что объясняется его взаимодействием с вирусными дцРНК, независимо от их молекулярного размера. Это означает, что взаимодействие P38 с дцРНК препятствует доступности субстрата для белков из семейства DCL, в частности DCL4. Это, в свою очередь, приводит к

ослаблению аккумуляции 21 нт кРНК нуклеазой. В то же время белок P38 не подавлял активность белка DCL2, синтезирующего 22 нт кРНК, но эффективно подавлял белковый комплекс RISC, взаимодействуя с AGO (Chattopadhyay et al., 2015). Такой механизм супрессии защитной системы интересен тем, что 22-нт кРНК, как было отмечено выше, проявляя сродство к белку AGO10, подавлял накопление AGO1 (Iki et al., 2018).

Накопленные на современном этапе исследований данные свидетельствуют о том, что так называемые вирусные супрессоры сайленсинга РНКи (viral silencing suppressors of RNA silencing, VSR), обладающие обширными биохимическими свойствами, необходимы для подавления РНКи хозяина как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровнях (Rakhshandehroo et al., 2017), а также на этапе передачи сигнала о развитии инфекционного процесса (Senshu et al., 2011).

Цистеин-богатый 17кДа белок γ b вируса штриховой мозаики ячменя (BSMN), хотя и не является необходимым для вирусной репликации и транспорта, оказывает большое влияние на процессы патогенеза, а взаимодействие вирусного белка с РНК является важной функцией белка γ b в подавлении РНКи. Первое косвенное указание на возможное участие белка γ b в подавлении РНКи было получено в экспериментах с мутантами вируса погрешности табака с нарушенным геном, кодирующим белок P16. Было установлено, что белок γ b взаимодействует с дцРНК через три Zn-связывающих сайта, расположенных в N (терминальной части белка), и стимулируется в присутствии ионов Zn (Yamamura et al., 2005). Продукт гена p122 ВТМ в растениях *S. tuberosum*, зараженных штаммами вируса дикого типа, подавлял транскрипцию белков PiDCL2, NtDCL2 и РНК-зависимой РНК-полимеразы в растениях табака *N. tabacum*, зараженных оомицетом *Ph. infestans*, соответственно. Нокаут-мутация гена p122 в линии ВТМ cr- Δ 122 восстанавливала способность указанных генов растения и оомицета экспрессироваться (Mascia et al., 2019). Высокая ингибирующая активность в отношении противовирусной РНКи была обнаружена у вирусных генов,

кодирующих РНКазы, относящиеся к семейству III (Kreuze et al., 2005). Кодированная вирусным геномом РНК-зависимая РНК-полимераза N1b, формирующая репликационные комплексы с участием хозяйских белков и супрессирующая NPR1-опосредованный иммунный ответ, является ответственной за репликацию вирусной РНК, а также за подавление фитоиммунной системы хозяина у таких потивирусов, как шарки сливы, мозаики турнепса, ВМС и YBK (Shen et al., 2020). Данные о важной противодействующей роли компонентов (белков), включенных в РНКи как растения, так и патогенного гриба описаны в обзорной работе Lax (Lax et al., 2020).

В геноме грибов идентифицированы гены, кодирующие гомологи белков RdR, AGO и DCL (Qian et al., 2016), и продукты этих генов обладали аналогичными функциями защитной активности против биотической инфекции, как у всех высших эукариот (Nguyen et al., 2008). У патогенного гриба *Verticillium nonalfalfae* идентифицированы по 2 белка для всех трех ключевых компонентов РНКи (AGO, DCL, RdR), а также выстроено их филогенетическое древо (Kunej et al., 2021). Были подтверждены существующие таксономические отношения в группе грибов *Ascomycete*, а также высокое сходство аминокислотных последовательностей генов, вовлеченных в РНКи между представителями *Hypocreomycetidae* и *Sordariomycetes*.

Грибы имеют активные пути РНКи, влияющие на их патогенность. Гриб *F. graminearum*, возбудитель фузариоза пшеницы, кодирует два белка Dicer, два белка Argonaute и пять белков RdR (Chen et al., 2015). Мутанты, лишённые одного или двух генов РНКи у этих видов, обычно теряют способность проникать через листья (Wang et al., 2018). Так, вирулентность *Fusarium graminearum* на листьях ячменя зависела от активности грибных белков DCL, ответственных за генерацию патогенных дцРНК, интерферирующих экспрессию ряда генов хозяина, таких как *HvEOL1*, *HvBAK1*, *HvSERK2* и *BdSERK2*, связанных с регуляцией этилен-жасмонатной сигнальной системы

(Werner et al., 2021). Аналогичный эффект наблюдался и у гриба *S. sclerotiorum*: мутанты по генам *AGO2* (Neurane et al., 2019) и двойные мутанты по гену *DCL 2/4* (Mochama et al., 2018) имели замедленный рост и пониженную вирулентность. Подавление уровня транскриптов гена *AGO2* также снижало вирулентность у грибов *Valsa mali*, и *F. oxysporum f.sp. lycopersici* (Jo et al., 2018). Хотя единичные нарушения в работе генов *DCL*, *RdR* гриба *Colletotrichum higginsianum* не влияли на вегетативный рост гриба, двойные мутанты $\Delta dcl1$, $\Delta dcl1\Delta dcl2$ и мутанты $\Delta ago1$ демонстрировали серьезные дефекты в морфологии конидий (Campro et al., 2016). Гриб *V. dahliae*, также использует малые РНК в качестве эффекторов, встраивая их в хозяйский белковый комплекс RICS, содержащий белки AGO1, арабидопсиса для подавления его (растительных) генов. Обнаружена способность ряда малых РНК гриба *B. cinerea* (Bc-siRNAs) подавлять накопление транскриптов ряда генов арабидопсиса и томатов, отвечающих за работу РНКи (*AGO1*) и иммунитета (Zhang et al., 2022). А двойное отключение работы генов и *BcDCL1*, и *BcDCL2*, вызывающее неспособность мутантов продуцировать Bc-siRNAs, подавляло его патогенность (Zhang et al., 2022).

При анализе сортов хмеля *Humulus lupulus* L., контрастных по устойчивости к грибу *V. nonalfalae*, обнаружено дифференциальное накопление транскриптов генов патогена, ответственных за РНКи, в зависимости от локализации в различных органах растения, а с использованием методов высокопроизводительного секвенирования и обширного биоинформационного анализа идентифицировали до 156 предшественников малых РНК (Worrall et al., 2019).

Обнаружено, что мРНК, транскрибируемые *Ph. sojae* и способствующие трансляции патогенных эффекторов РНК (PSR1 и PSR2), нацелены на РНКи хозяина. PSR1 ингибирует биогенез микроРНК, тогда как PSR2 нацелен исключительно на киРНК (de Vries et al., 2019; Xiong Q et al., 2014). Аналогичным образом, *B. cinerea* продуцирует малые РНК (Bc-siRNAs) во время инфекции, чтобы вызвать замалчивание у томата и арабидопсиса генов

митоген-активируемой белковой киназы-1 (mitogen-activated protein kinase 1 — MAPK1) и MAPK2, пероксиредоксина (peroxiredoxin-2F — PRXIIIF) и киназы, связанной с клеточной стенкой (cell wall-associated kinase — WAK). У томата Bc-siRNAs подавлял накопление MAPKKK4 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4), напрямую влияющей на устойчивость к грибу *B. cinerea* (Zhang et al., 2022). Аналогичным образом возбудитель ржавчины пшеницы *P. striiformis f. sp. tritici* (Pst) продуцирует микроРНК-подобную РНК 1 (Pst-miR1), которая подавляет защиту пшеницы во время ее взаимодействия с инфекционными структурами гриба. Замалчивание предшественника Pst-miR1 повышало устойчивость пшеницы к инфекции Pst (Wang et al., 2017). Анализ микроРНК в растениях пшеницы, инфицированной грибом *P. Striiformis*, показал, что большая доля синтезируемых в патогенной системе малых РНК направлены против генов, ответственных за экспрессию белков, имеющих функциональные домены RabGAP/TBC, «цинковые пальцы», цистеин-богатой рецептор-подобной протеинкиназы и, возможно, важны при взаимодействии генов устойчивости пшеницы с генами авирулентности патогена (Feng et al., 2017). Кроме того, в транскриптом, вырабатываемом возбудителями мучнистой росы злаков *B. graminis f. sp. hordei* (Bgh) и *B. graminis f. sp. tritici* (Bgt), данные последовательности РНК, полученные из инфицированной пшеницы, выявили шесть малых РНК от Bgt и пятнадцать малых РНК от Bgh. Их последовательности нуклеотидов были комплементарны большому числу растительных генов, что указывает на их многофункциональность. Большая часть таких генов включена в процессы транспорта ацил-КоА, биосинтеза убихинона, прорастания семян и макромолекулярный катаболизм. Эти малые РНК предсказали мишени, присутствующие исключительно в растениях, со связанными функциями, изменяющие первичный метаболизм, что позволяет предположить наличие переноса РНК между представителями разных царств живого мира (Wong-Vajracharya et al., 2022). Эффективность переноса малых РНК от растений в мицелий патогенных грибов и последующий запуск РНКи доказан с

использованием GFP модифицированных грибов *M. oryzae*, *Venturia inaequalis*, *Ph. infestans*, *Histoplasma capsulatum* и *Blastomyces dermatitidis*, а также растений, генерирующих антиGFP малых РНК (Borah et al., 2021). Наконец, у биотрофного оомицета *H. arabidopsidis* обнаружено 34 малых РНК, способных к транслокации в клетках и подавлению хозяйских генов-мишеней. При этом арабидопсис, мутантный по биогенезу малых РНК, был восприимчив к грибу *H. arabidopsidis*, представляя тем самым важную их роль в иммунитете растений (Dunker et al., 2020). Группа Хайлинга Джина показала, что некротроф *B. cinerea* продуцирует небольшие РНК во время инфекции, перехватывающие РНКи хозяина, для отключения генов, ответственных за фитоиммунный ответ (Zhang et al., 2022). Следовательно, взаимодействие хозяина с патогеном постоянно развивается, и РНКи стала эволюционно приобретенным преимуществом не только для растений, но и для патогенов. Между фитоиммунным ответом и развитием инфекции патогена сохраняется баланс, обусловленный работой РНКи (Lax et al., 2020).

И другие участники растительного метабиома, вирусы или эндосимбионты, могут вовлекаться во взаимное воздействие на работу РНКи (Mascia et al., 2019). Так, показано, что колонизация корней орхидеи эндофитным грибом *Piriformospora indica* усилила накопление в листьях мРНК, кодирующих белки, содержащие домен NBS-LRR и снижая уровень miR524650, miR1510a*, miR2118 и miR5246, направленных против транскриптов этих белков, и обеспечила лучшую устойчивость растений к бактериальной гнили, вызываемой *Erwinia chrysanthemi* (Ye et al., 2019). Особый интерес в связи с отмеченной выше коррекцией грибом *P. indica* эффективного функционирования фитоиммунитета представляет то, как малые РНК могут регулировать симбиотические взаимоотношения между растением и микоризными грибами, поскольку они, также, как и все представители царства грибов, обладают всеми необходимыми компонентами РНКи (Raman et al., 2017). Во время установления симбиоза большинство малых РНК эндосимбионтов нацелена на систему защиты растений.

Например, при формировании симбиотических отношений эктомикоризного гриба *Pisolithus microcarpus* с корнями эвкалипта *Eucalyptus grandis* экспрессируется Pmic_miR-8, которая, как показывают авторы, в последствии, обнаруживается в клетках хозяина (Wong-Bajracharya et al., 2022). Сравнение нуклеотидных последовательностей Pmic_miR-8 с комплементарными в геноме арабидопсиса последовательностями ДНК показало, что она может узнавать гены, кодирующие семейство ДНК нуклеаз K00246 и L01882, а также фрагмент домена NB-ARC гена, кодирующего защитный ген E03170. Показано регулируемое эндофитными грибами *Trichoderma atroviride* и *T. cretense* изменение уровня транскриптов miR398, miR167 и miR159 в растениях пшеницы в ответ на инфицирование продуцирующим микотоксины грибом *Fusarium culmorum*, способствующее защите от патогена (Fukudome et al., 2011; Salamon et al., 2021). Обнаружено активное участие малых РНК в регуляции взаимоотношений арбускулярных микоризных грибов с люцерной *Medicago truncatula* (Bazin et al., 2013), томатами *Solanum lycopersicum* (Couzigou et al., 2017) и рисом *Oryza sativa* (Etemadi et al., 2014). При этом большинство индуцированных микроРНК были нацелены на гены, ответственные за гормональный ответ. Например, микроРНК E4D3Z3Y01BW0TQ нарушала функционирование сигнального пути гибберелловой кислоты (Wu et al., 2016). В тоже время в работе Vega-Arreguín и соавторов (2014) было показано, что растения табака (*Nicotiana tabacum*) способны узнавать последовательность гена *PcAvr3a1* патогенного гриба *P. capsici* и противостоять инфекции посредством гиперчувствительной ответной реакции (HR).

Известно, что у грибов РНКи способна активироваться посредством либо процесса «подавления», либо за счет биогенеза киРНК, в зависимости от вида гриба, стадии развития, а также от типа целевой последовательности. У гриба *N. crassa* подтверждено наличие нескольких путей глушения (Dang et al., 2011). Ряд связанных с подавлением процесса квеллинга (qde) исследований на мутантах *N. crassa* указывает на присутствие малых РНК в механизме

подавления, а также на дефектность мутантов *qde-1* по RdR. Кодирующие RdR гены *SDE1/SGS2 Arabidopsis thaliana* и EGO-1 у *Caenorhabditis elegans*, оказались необходимы для пост-транскрипционного глушения генов (PTGS) и РНКи, соответственно. Ген *QDE-2*, кодирующий белковый продукт с доменом piwi-PAZ (PPD или Argonaute), важный и консервативный компонент РНКи в различных эукариотах. В свою очередь *qde-3* кодирует ДНК-геликазу RecQ-типа. Недавно показано, что геликаза *Neurospora QDE-3 RecQ* и ее гомолог *RecQ-2* участвуют в репарации рекомбинации (Dang et al., 2011).

Некоторые компоненты РНКи могут отсутствовать у ряда видов грибов, например, из таксонов *Ustilaginomycotina*, *Saccharomycotina*, *Wallemiomycetes* и клады *Microsporidia*, что указывает на необязательность РНКи для них и, вероятно, их способность обходиться без этого физиологического механизма, а в случае с патогенными формами - рекрутировать хозяйскую систему глушения генов в своих целях (Choi et al., 2014). У биотрофа *Erysiphe necator* отсутствуют белки RdR и ДНК-метиلاза (Dunker et al., 2020). Возбудитель головни кукурузы *Ustilago maydis* утратил гены, кодирующие основные компоненты РНКи. В то время как родственные ему виды, такие как возбудитель головни ячменя *Ustilago hordei*, имеют функционально эффективную РНКи (Yadav et al., 2018). М. Дебишир и соавт. (Derbyshire et al., 2019), изучая малые РНК гриба *S. sclerotiorum*, отмечают, что почти все идентифицированные локусы, отвечающие за их генерацию, были связаны с ретротранспозонами, в особенности с LINE1 (до 40%). Они находились вне кодируемой области генома, при этом область, включающая эти локусы, оказалась более полиморфной, что говорит о быстро эволюционирующей совокупности малых РНК-эффекторов, связанных с мобильными элементами генома. Высказывается мнение, что случайное действие малых РНК патогена на иммунитет хозяина дает патогену селективное преимущество (Третьякова и др., 2020). С другой стороны, потеря компонентов, отвечающих за РНКи у грибов, вероятно, связана с эволюцией вирулентности, так как свободное движение ретротранспозонов (отсутствие контроля за движением мобильных

элементов) может обеспечивать быстрые адаптационные ответы на стрессовые воздействия среды (Lax et al., 2020).

Еще одно интересное явление у некоторых видов патогенных грибов – это синтез малых РНК, получивших название miРНК (microRNA-like RNA — miРНК-подобная РНК) (Zhang et al., 2022). Например, miR1 представлена только у *P. striiformis Westend.*, а у других возбудителей ржавчины *Puccinia graminis Persoon* и *Puccinia triticina Erikss.* она отсутствует. Соответственно, образование MILR1 только у одного вида может быть результатом его эволюции и адаптации к паразитированию на строго определенном виде (Chen et al., 2015). Данная miРНК участвовала в «межродовой» РНКи, воздействуя на экспрессию гена *PR2* (β -1,3-глюканаза) в пшенице. Ее высокий уровень, снижая экспрессию гена *PR2*, усиливал чувствительность пшеницы к ранее авирулентному штамму патогена. Тогда как ингибирование накопления предшественника miРНК укрепляло устойчивость пшеницы к вирулентному штамму *P. striiformis* (Wang et al., 2017).

1.7 Фитогормоны и РНК-интерференция

В функционировании РНКи в растениях важное место занимают фитогормоны. Так как салициловая кислота (СК) - один из ключевых факторов, ответственных за индукцию системной приобретенной устойчивости (СПУ) к биотрофам интерес представляет ее способность участвовать в работе РНКи. Координированная работа белков, вовлеченных в СПУ, с белками, участвующими РНКи, пока не полностью расшифрована. Основные компоненты РНКи такие как эндонуклеазы DCL2, DCL3 или DCL4, как оказалось, не связаны с СПУ, индуцированной СК или ее функциональными аналогами (Matsuo et al., 2019). Тогда как накопление транскриптов гена *RdR1* происходило под влиянием СК и зависело от экспрессии белка NPR1 (Lee et al., 2016). Соответственно, СК-индуцированная устойчивость связана с РНКи через ген *RdR1* и координируется его продуктом. В свою очередь, экспрессия гена *RdR1* усиливала экспрессию генов,

кодирующих RdR6 (компонент РНКи) и альтернативную оксидазу (про-/антиоксидантная система). Такая координация, по всей видимости является гибкой, поскольку у *A. thaliana*, накапливающих вирусный эффекторный белок 2b, экспрессия гена *AGO2* становилась салицилат чувствительной (Lewsey et al., 2016). Буквально недавно обнаружено, что СК и miR403a, комплементарная фрагменту гена *NbAGO2*, эффективно регулировали экспрессию гена *NbAGO2* у табака *N. benthamiana* (Diao et al., 2019). Уровень транскриптов гена *AtRdR1* выше у *A. thaliana*, предварительно обработанной СК, тогда как ген *AtRdR2* не чувствителен к ней (Matsuo et al., 2019). Ген *StRdR1* *S. tuberosum* показал высокую чувствительность к СК (Hunter et al., 2016). У перца *Capsicum annum* L. экспрессия гена *CaRdR1* стимулировалась под влиянием СК, абсцизовой кислоты (АБК), пероксида водорода (H₂O₂) (Qin et al., 2017). Анализ *in silico* промоторной части генов семейства RdR1-б различных видов растений показал, что основными их транскрипционными факторами являются белки MYB44, AS1/AS2 и WRKY1 (Prakash et al., 2019). Подавление экспрессии *NaRdR1*, *NaRdR2*, но не *NaRdR3* повышала восприимчивость табака *Nicotiana attenuata* к грибу *Fusarium brachygibbosum* (Pradhan et al., 2020).

Несмотря на то, что в физиологических реакциях СК и АБК часто обсуждаются с позиции антагонистов, они могут совместно модулировать различные защитные ответы, в том числе и РНКи, например, против вирусов, на уровне регуляции экспрессии генов, кодирующих транскрипционные факторы (транс-факторы), а также основные белки явления РНКи. Важную роль в СК регулируемой устойчивости играют miR160. Так, линии картофеля с подавленной экспрессией miR160 не запускали СПУ, регулируемую СК. В связи с тем, что сигнальные системы, регулируемые СК и ауксинами, проявляют противоположную направленность, можно полагать, что miR160 вовлечена в их перекрестное взаимодействие (Natarajan et al., 2018). Показана важность TAG-производной 21-но киРНК опосредовано индуцированной СК в метилировании ДНК у арабидопсиса (Dowen et al., 2012).

Участие АБК в защите растений от грибной инфекции ранее обсуждалось (Maksimov et al., 2009). Этот фитогормон, являясь регулятором ответных реакций, как правило, на абиотический стресс, вовлекается и в фитоиммунные процессы, препятствуя колонизации патогенов в растительных тканях посредством регуляции работы устьиц, экспрессии генов про-/антиоксидантной системы, а также синтеза каллозы. Наконец, обнаружена важная роль АБК в регуляции работы РНКи и, соответственно, в формировании фитоиммунитета (Westwood et al., 2013). У *A. thaliana*, гиперсинтезирующей АБК, индуцируется накопление транскриптов генов *AtAGO4* и *AtAGO10*. Хотя в фитофизиологических реакциях СК и АБК часто обсуждаются с позиции антагонистов, они могут совместно модулировать различные защитные ответы, в том числе и РНКи, на уровне регуляции экспрессии генов, кодирующих транскрипционные факторы (транс-факторы), а также основные белки РНКи. Поскольку только в мутантных по уровню СК растениях АБК вызывала экспрессию генов *AGO1* и *RdR1*, вероятно этот фитогормон запускает экспрессию генов каскада сигналов салицилат-зависимой экспрессии, а СК регулирует интенсивность накопления защитного продукта (Matzke et al., 2015). Выявлено, что растения с высоким уровнем синтеза *AGO1* слабочувствительны к АБК и, наоборот, при нарушении синтеза *AGO1* формируют гиперчувствительность к АБК. На растениях сои устойчивость к вирусу мозаики, опосредованная обработкой АБК, сопровождалась отложением каллозы в зоне плазмодесмы накоплением транскриптов генов *AGO1*, *AGO4*, *AGO9*, *RdR2* и *RdR6* (Wang et al., 2017). Показано, что в регуляции синтеза *AGO1* с участием АБК важная роль принадлежит *miR168*, регулирующей противовирусный фитоиммунитет (Zhang et al., 2022; Yu et al., 2017). Полученные данные говорят о тесной связи РНКи с АБК-опосредованным сигнальным путем формирования устойчивости растений к вирусам.

Жасмонаты индуцируют в растениях устойчивость к некротрофам. В отношении биотрофных и гемибитрофных патогенов их роль противоречива.

У табака в формировании устойчивости по жасмонатному сигнальному пути к грибу *F. brachygibbosum* оказалось критичным наличие белка NaAGO4 (Pradhan et al., 2020). Снижение накопления ЖК, обусловленное индукцией miR319, в растениях *O. sativa*, инфицированных вирусом лохматой карликовости (rise ragged stunt virus, RRSV), формировало восприимчивость к вирусу (Villalobos-Escobedo et al., 2016). Анализ экспрессии генов *AGO* в растениях *O. sativa* в условиях инфицирования вирусом штриховатости (rice stripe virus, RSV) показал, что вирус многократно индуцирует гены *OsAGO1a*, *OsAGO1b*, *OsAGO3* и *OsAGO18*, транскрипты которых, вместе с тем, в жасмонат-нечувствительных *coil-13* растениях накапливались в меньшей степени, что коррелировало со степенью развития вируса (Zhang et al., 2018). Показано, что активация бактериями *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 устойчивости *A. thaliana* по жасмонатному сигнальному пути, находится под контролем miR846. Белок AGO4 оказался важным в формировании защиты у *N. attenuata* к грибу *F. brachygibbosum*, а замалчивание его синтеза нарушало работу жасмонатной сигнальной системы (Pradhan et al., 2020). Такое нарушение происходило вследствие отключения синтеза ЖК, а устойчивость к грибу восстанавливалась после обработки растений ЖК. Таким образом, полученные данные дополнительно объясняют, как защитные сигнальные системы и РНКи, могут совместно работать в растениях.

1.8 Хозяин-индуцированное (ХИГС) и спрей-индуцированное (СИГС) подавление активности генов

Фундаментальная защитная роль РНКи в растениях, в первую очередь, проявляется в формировании уникальной естественной защитной стратегии организма и описывается как хозяин-индуцированный генный сайленсинг (ХИГС, host-induced gene silencing (HIGS)), эффективно работающий не только против вирусов, но и фитопатогенных грибов и оомицетов (Nunes et al., 2012). На современном этапе исследований описано формирование ХИГС с вовлечением хозяйских белков, отвечающих за РНКи, на пшенице и ячмене,

инфицированных возбудителем мучнистой росы биотрофом *Blumeria graminis* (Dutta et al., 2017), пшеницы – возбудителем ржавчины *Puccinia tritici* (Panwar et al., 2013), пшеницы и банана, инфицированных грибами рода *Fusarium* (Zhang et al., 2022), картофеля и перца, инокулированных возбудителями фитофтороза *Ph. infestans* (Jahan et al., 2015) и *Ph. capsica* (Vega-Arreguín et al., 2014), соответственно, а также у томатов и арабидопсиса, инфицированных возбудителем вертициллеза (Song, Thomma, 2018).

Природный ХИГС предполагает возможность искусственной модификации генома хозяина с помощью внедрения в него последовательности, отвечающей за транскрипцию шпилечной дцРНК, содержащей информацию о целевом гене патогена. Идеи о возможности терапевтического использования РНКи для подавления экспрессии генов в организмах появились уже вскоре после его открытия (Coburn et al., 2003). В ранних работах РНКи в основном использовалась для повышения устойчивости растений к болезням путем внедрения в геном транскрибируемых фрагментов ДНК, содержащих палиндромные последовательности генов эффекторов. Так, в обзорной работе Sang H. и Kim J. (2020) приводится не менее 11 вариантов эффективных технологий фитозащиты с использованием методов РНКи.

Искусственные дцРНК, генерируемые растениями, способны индуцировать «молчание» генов у грибов, нематод, насекомых и оомицетов, что указывает на их успешный перенос от хозяина в клетки патогенов (Wang et al., 2016). РНК структуры, содержащие гомологии, к генам синтазы хитина, важного компонента клеточной стенки грибов, внедренные в геном растений, обеспечивали их защиту от гриба *S. sclerotiorum* (Ji et al., 2021). Пшеница, накапливающая дцРНК против патогенных генов, кодирующих хитин-синтазы (Chs3b) или β -1, 3-глюкансинтазы (Werner et al., 2021), может вызывать серьезные дефекты в формировании клеточных стенок грибов *Fusarium graminearum* и *Fusarium culmorum*, соответственно, и демонстрируют повышенную устойчивость к этим патогенам. Экспрессия

трех конструкций РНК в двух различных сортах пшеницы трансгенных по *FgCYP 51* (гены биосинтеза эргостерола) и *FgChs3b* (ген хитин-синтазы) обеспечила высокую устойчивость культуры к фузариозу колоса и ограничила развитие гриба (Cheng et al., 2015). С использованием специфических векторов, содержащих сенс- и антисенс-фрагменты гена, кодирующего МАР-киназу 1 (Pathogenicity MAP Kinase 1, РМК1) *Rhizoctonia solani*, получены растения риса, показавшие снижение степени поражения грибом по технологии ХИГС (Tiwari et al., 2017). Экспрессия дцРНК, комплементарной мРНК МАР-киназы (PtМАРК1, 520 нп) или циклофилина (PtСУС1, 501 нп) возбудителя ржавчины *Puccinia triticina* в пшенице, показала эффективное глушение соответствующих генов и значительное последующее за глушением генов снижение патогенности грибов. Пролиферация клеток мицелия *P. triticina* была снижена вместе с уменьшением числа транскриптов генов-мишеней грибов в устойчивых растениях на основе РНКи (Panwar et al., 2018).

Супрессия факторов вирулентности (Ave1, Sge1 и NLP1) гриба *V. dahliae*, посредством ХИГС, снижала восприимчивость арабидопсиса и томатов к вертициллезу (Yang et al., 2015). Растения томатов, генерирующие фрагменты генов, РЕХ6, кодирующих белок фактора биогенеза пероксиосом 6, принадлежащий к семейству белков АТФазы (FoРЕХ6-RNAi) и β -1,3-глюкозилтрансферазы (FoGAS1-RNAi) гриба *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), важных в биогенезе клеточной стенки и морфогенезе мицелия, проявили устойчивость к этому грибу (Tetorya et al., 2021).

В качестве эффективного метода искусственного запуска целевого РНКи предлагается и транспластомная модификация растений, когда дцРНК продуцируются в пластидах, где уровень экспрессии дцРНК может достигать 0,4% от общего уровня РНК (Zhang et al., 2015).

Глушение генов 1,3- β -глюкозилтрансферазы (*BgGTF1* и *BgGTF2*) с помощью технологии вирус индуцированного генного сайленсинга (ВИГС), на базе вируса мозаики ячменя (BSMV), значительно замедлил рост гриба *P. striiformis* f. sp. *tritici* (Qi et al., 2018). Ячмень, накапливающий дцРНК,

нацеленную на ген авирулентности *Avra10*, соответствующий гену устойчивости *Mla10*, показал снижение уровня транскриптов генов возбудителя мучнистой росы *Blumeria graminis* (Nowara et al., 2010). Лocus устойчивости к милдью (Mlo) кодирует трансмембранный белок, действующий как отрицательный регулятор фитоиммунитета в неинфицированных тканях, участвует в защите от гибели клеток, а также в ответах на биотические и абиотические стрессы (Acevedo-Garcia et al., 2017). Подавление экспрессии гена *TaMlo* пшеницы через ВИГС формировало устойчивость пшеницы к мучнистой росе (Várallyay et al., 2012). В другой работе, одновременный нокаут трех гомеологических генов *TaMlo*, с использованием технологии геномного редактирования TALEN (transcription activator - like effector nuclease), а также полученные при помощи комплексного использования CRISPR/Cas9 и РНКи мутации в аллеле *TaMLO-A1*, формировали у растений пшеницы устойчивость к патогену (Wang et al., 2014).

Нацеливание на гены метаболизма жирных кислот у патогена с помощью РНКи оказалось важной стратегией для создания устойчивости к грибковым болезням. РНКи-опосредованное подавление гена риса *OsSSI2* привело к повышенной устойчивости к *Magnaporthe grisea*. Кроме того, она могла быть достигнута подавлением генов *OsFAD7* и *OsFAD8*, представляющим собой десатуразу жирных кислот (Yara et al., 2007). Показано, что в пшенице 24 вида miРНК участвуют в ответах на атаку *B. graminis* f. sp. *tritici* (Xin et al., 2010). Малые РНК *Osa-miR7695* и *Osa-miR7696* противоположно регулировали накопление ассоциированного с иммунитетом белка *OsNramp6* в ответ на инфицирование *M. oryzae* в растениях риса (Kamthan et al., 2015).

С использованием метода РНКи доказана важность рецепции в растениях патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП), в частности хитина, в дальнейшем развитии оксидативного взрыва в зоне инфицирования. Сайленсинг гена *CEV1P*, ответственного за связывание

хитоолигосахаридов в растениях *O. sativa*, с помощью технологии ХИГС, ингибировал образование активных форм кислорода и экспрессии генов, участвующих в иммунном ответе (Kouzai et al., 2014). С использованием антисенс-конструкций к генам *FUM1* и *FUM8* фуминозин-продуцирующих штаммов *F. verticillioides* на кукурузе позволили многократно снизить концентрацию токсина (Johnson et al., 2018).

Возможность запускать явление РНКи путем экзогенного применения дцРНК в качестве спреев, с целью нарушения экспрессии жизненно важных генов вредителей или патогенов, открывает новые возможности в развитии современных экологически чистых технологий и стратегий защиты растений, не связанные с растительным трансгенозом и создание генно-модифицированных растений. Это направление фитозащиты развивается очень быстро и описывается термином «индукция замолкания генов с помощью опрыскивания» или спрей индуцированного генного сайленсинга (СИГС, spray induced gene silencing, SIGS). Суть этой технологии заключается в распылении препарата, содержащего целевую дцРНК, по поверхности, например, листа растений (Koch et al., 2021). Уникальность этого метода сочетается также с тем, что с одной стороны сами дцРНК, а также их носители, могут характеризоваться свойствами ПАМП и запускать защиту растительной клетки, связанную с классическими сигнальными системами защиты РТ1 и ЕТ1, опосредованными активацией рецепторных киназ SERK (Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase) и MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases), взаимодействующих с РНКи. А с другой, дцРНК могут проникать в ткани растения, амплифицироваться в клетках, перерабатываться в киРНК, как правило 22 нт, и индуцировать природные механизмы РНКи и запустить замолкание целевых генов вредителя или патогена после аппликаций препаратами дцРНК поверхности тканей (Hernández-Soto, 2021).

Использование дцРНК в виде спрея имеет множество преимуществ перед химическими препаратами. В связи с высокой комплементарностью дцРНК к определенному фрагменту целевого гена, продукт которого отвечает

за вирулентность или жизненно-важные функции патогена, препараты на их основе могут действовать специфически и есть возможность использования в одном препарате нескольких форм дцРНК направленных на различные области гена или даже на разные гены целевого организма. Такая схема принципиально отличается от использования генетической модификации самих растений, но требует разработки методов доставки «РНКи-пестицида», в том числе и «РНКи-фунгицида», защиты РНК-молекул от солнечного света, смыва дождем. При создании препаратов на основе РНКи необходимо помнить и о том, что регуляция замалчивания защитных генов в растениях, заселенных вредителями, может быть связана и с эндосимбионтным микробиомом, а также виромом, которые, могут регулировать РНКи в растительном метабиоме (рис. 2).

Стратегия СИГС считается экологически чистой и впервые применена в работе Koch (Koch et al., 2021), где, используя дцРНК, нацеленную на ген цитохрома P450 (CYP3) в *F. graminearum*, наблюдали подавление роста патогена в непосредственно обработанных этой РНК листьях пшеницы. В другой работе, эта же группа исследователей усовершенствовала метод, что позволило избавить ячмень от корневой гнили (Biedenkopf et al., 2020). Сравнение методов ХИГС и СИГС на модельных растениях арабидопсиса и ячменя показало проявление большей эффективности в защите от колонизации грибом последней (Song et al., 2018). Хотя технология СИГС активно изучается (Gebremichael et al., 2021), исследования по ее использованию все еще находятся на стадии накопления материала. При этом можно полагать, что внешнее воздействие может не только непосредственно подавлять функционирование генов патогена, но и воздействовать на функцию хозяйского генома.

Так, сообщалось об успешном применении метода СИГС с использованием видоспецифических дцРНК на рапсе (*Brassica napus*) для защиты от *B. cinerea* и *S. sclerotiorum* (McLoughlin et al., 2018). При внесении дцРНК, комплементарной гену CYP51, в жидкую культуру *F. graminearum*

наблюдали слабый рост гриба и изменение его морфологии. Создание линий *A. thaliana* и ячменя, экспрессирующих дцРНК, привело к значительному повышению их устойчивости. Рост мицелия был ограничен в местах инокуляции патогена, а инокулированные зерновки ячменя практически свободны от инфекционных структур. Обработка *in vitro* спорами *F. graminearum* дцРНК длиной 791 п.н, нацеленной на ген *FgCYP51* (ген биосинтеза эргостерола - цитохром P450 ланостерол C-14 α -деметилазы), в культуре, а также *in vivo* на ячмене, подавляла рост грибов как в областях, где распылялась дцРНК, так и в дистальных частях листьев (Koch et al., 2021). В листьях томатов, клубники, винограда, салата, лука, розы и арабидопсиса подавление экспрессии грибного гена *BcDCL1-2* гриба *B. cinerea*, с использованием целевых дцРНК и технологии СИГС значительно снижало развитие серой гнили (McLoughlin et al., 2018). Этот подход открыл новые возможности в развитии экотехнологий для улучшения растений за счет подавления специфических генов, продукты которых сопровождают или, даже, усугубляют развитие стрессового фактора. В этой связи наиболее перспективным является экзогенная доставка компонентов РНКи, исключая необходимость в модификации генома сельскохозяйственных культур, и который может быть использован против практически любого патогена и вредителя, реагирующего на подходы РНКи (Wang et al., 2016).

Отмечены положительные эффекты экзогенного использования молекул РНК против фитопатогенных грибов аскомицетов (Gebremichael et al., 2021). СИГС с использованием дцРНК, нацеленных на гены *FgAGO* и *FgDCL* гриба *F. graminearum*, способствовал защите листьев ячменя от инфекции (Werner et al., 2020). Аналогично, вирулентность *F. asiaticum* снизилась, после распыления на колеоптили пшеницы дцРНК, нацеленной на ген миозина 5 (Werner et al., 2020). В этом случае молекулы дцРНК, комплементарные нескольким регионам целевого гена, оказывали непосредственное влияние на рост мицелия, жизнедеятельность и вирулентность гриба. В связи с неспособностью гриба *F. asiaticum* поддерживать синтез вторичных малых

РНК, экспрессия целевого гена восстанавливалась после того, как все молекулы экзогенной дцРНК были истрачены. Продолжительность защитного эффекта препарата была дольше, если дцРНК изначально попадали в растения. Это объяснялось тем, что в растительных клетках, в отличие от клеток гриба, дцРНК могут амплифицироваться.

Способность дцРНК предотвращать и противодействовать инфекции *B. cinerea* проверена на винограде *Vitis vinifera*, где применялись три независимых подхода для доставки дцРНК, в частности с использованием в качестве мишени эксперимента грибного гена *BcDCL1/2* (Wang et al., 2016), а именно: опрыскивание листьев, адсорбция дцРНК на черешках и послеуборочное опрыскивание гроздей. Важно заметить все 3 метода снижали вирулентность *B. cinerea* и, соответственно, развитие серой гнили не только на растениях, но и плодах (Nerva et al., 2020). Торможение роста гриба *B. cinerea* на поверхности фруктов, овощей и цветов после их обработки дцРНК на основе генов *BcDCL1/2* показывает потенциал экзогенной дцРНК как нового поколения экологически безопасных препаратов для борьбы с патогенами и при хранении. Эти результаты демонстрируют, что дцРНК мобильна, а экзогенное применение дцРНК может послужить основой для разработки новых подходов в создании препаратов для защиты сельскохозяйственных культур, в том числе и от грибковых заболеваний, как в полевых условиях, так и в пост уборочный период. Причем, применение экзогенных дцРНК обеспечивает в полевых условиях более краткосрочную защиту в сравнении со временем послеуборочного хранения, где продукты не подвергаются воздействию ультрафиолетового излучения. Но, к сожалению, эффективные протоколы для использования препаратов на основе дцРНК при хранении фруктов и овощей пока не определены. В работе (Vorah et al., 2021) описывается ряд примеров конструирования генно-инженерных векторов для запуска РНКи в растениях и подавления роста и развития патогенных грибов. Таким образом, экзогенное применение молекул дцРНК с потенциалом запуска РНКи - эффективный инструмент в современных платформах защиты

и улучшения урожая. При явном положительном защитном эффекте целевых дцРНК в экспериментальных условиях, остаются вопросы по подбору гиперпродуцентов дцРНК, массовому накоплению целевого продукта, обеспечению его сохранности и использования в полевых условиях и в условиях хранения. В обзорной работе (Hernandez-Soto et al., 2021) описано 9 вариантов доставки дцРНК в растения, преимущественно для защиты от насекомых, но по всей видимости некоторые из них можно применить и в отношении патогенов.

Так как специфичность РНКи зависит от идентичности последовательности между малыми РНК и мРНК-мишенями, существует риск нецелевого эффекта, который может привести к замалчиванию других транскриптов, содержащих достаточную гомологию с такими малыми РНК (Casacuberta et al., 2015). Можно разработать дцРНК, нацеливающиеся на несколько групп патогенов, как например произошло с дцРНК, нацеленных на ген $\beta 2$ -тубулина гриба *Fusarium asiaticum* (Gu et al., 2019). Эти дцРНК проявили эффективность дополнительно и против *B. cinerea*, *M. oryzae* и *Colletotrichum truncatum* в клетках пшеницы, огурца, ячменя и сои, соответственно (Gu et al., 2019), по всей видимости, связанной с относительно высокой консервативностью ДНК, ответственной за экспрессию соответствующего продукта и даже фрагмента (домена) этого продукта, с целью выключения которого подобрана конструкция. Но, поскольку такое отклонение от цели может произойти даже на хозяине, необходим внимательный подбор эффективных дцРНК к генам-мишеням, исключая их гомологию с другими нецелевыми хозяйскими транскриптами и генами эндофитной и симбиотрофной микробиоты. Искусственное снижение экспрессии гена *PhMLO1* действительно повысила устойчивость петунии к мучнистой росе, но нокдаун привел к плейотропным эффектам на рост и развитие, что говорит о необходимости внимательного отношения при разработке стратегий создания устойчивости петунии к возбудителю мучнистой росы с помощью РНКи (Jiang et al., 2016). По всей видимости,

продукт гена *PhMLO1*, кроме формирования чувствительности к мучнистой росе, выполняет и другие важные физиологические функции в растении. К сожалению, пока представленные технологии можно применять только к культурам, доступным для эффективной трансформации. Кроме того, у общества все еще есть опасения по поводу потребления продуктов, полученных из генно-модифицированных организмов, находящихся под строгим контролем. Нельзя забывать и о разностороннем эффекте дцРНК в РНКи, связанных с генами, кодирующими белки рецепции и защиты.

При разработке стратегии противогрибковой защиты на основе РНКи, необходимо учитывать жизненную важность гена-мишени. Так, дцРНК, полученная из нескольких областей гена *Myosin 5* или *b2*-тубулина гриба *Fusarium asiaticum*, различалась по эффективности (Šečić et al., 2021). Использование *in vitro* дцРНК, направленных против генов, кодирующих аденилатциклазу, альфа и дельта субъединицы ДНК-полимеразы, грибов *F. Oxysporum*, *f. sp. cubense* и *Mycosphaerella fijiensis*, показало их противогрибную активность (Mumbanza et al., 2013). Искусственный нокаут гена DMR6 (Downy Mildew Resistance 6) в растениях базилика *Ocimum basilicum* с привлечением технологий CRISPR/Cas9 и РНКи подавлял развитие возбудителя ложной мучнистой росы до 93% (Hasley et al., 2021).

Важным моментом в последующем использовании дцРНК в РНКи на основе СИГС в производственных целях является подходы к их наработке. На современном этапе показана возможность наработки дцРНК на культурах *Escherichia coli* и *Pseudomonas syringae*, а также в клетках дрожжей *Yarrowia lipolytica* и *Sacharomyces cerevisiae* (Álvarez-Sánchez et al., 2018). Штамм *E. coli* HT115 (DE3), содержащий про-фаг λ DE3, кодирующий индуцируемый изопропил β -D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG) ген полимеразы T7 и дефицитный по РНКазе III, активно используется для получения большого количества дцРНК, с последующим автолизом, эффективных против *A. flavus* (Guan et al., 2021). Выделенная из такой линии бактерий дцРНК, успешно подавляла выработку грибами афлатоксинов (Guan et al., 2021). Другая

бактериальная культура, *P. syringae* Van Hall, содержащая RdR бактериофага phi6 (Niehl et al., 2018), позволяла синтезировать большие молекулы дцРНК (>2600 н.о.), стабильность которых поддерживалась до 20 дней (Niehl et al., 2018). Дрожжи *Y. lipolytica* показали себя как удобный продуцент для производства и доставки дцРНК-ORF89 (Hasley et al., 2021). Экспрессионная система на основе культуры дрожжей *S. cerevisiae*, лишённых генов *DCL-2* и *AGO-2*, оказалась также достаточно удобной и по эффективности сравнимой с бактериальными культурами (Drinnenberg et al., 2009).

В связи с важностью стабилизации дцРНК, в ряде работ была показана возможность его осуществления с использованием наночастиц (Gebremichael et al., 2021; Werner et al., 2020). В недавнем исследовании сообщалось о получении наногидрогеля, содержащего нуклеазу Cas9 и однонаправленную РНК (Ding et al., 2019). Загрузка РНКи, индуцирующего дцРНК, в слоистые нанослои двойной гидроксидной глины позволяет обеспечить устойчивую сохранность дцРНК в течение 30 дней (Mitter et al., 2017).

1.9 Симбионты и эндофиты

Симбионты и эндофиты могут быть как индукторами экспрессии пре-микроРНК через механизм ПАМП индуцированного защитного ответа в растениях (ХИГС), так и непосредственными генераторами дцРНК. Штамм *Bacillus* AR156 запускал устойчивость, подавляя накопление miR472 и активируя опосредованный белками, содержащими домен NB-LRR, иммунитет у арабидопсиса (Jiang et al., 2020). Инокуляция арабидопсиса клетками *B. amyloliquefaciens* FZB42 подавляла специфическую экспрессию miR846, индуцируя устойчивость в них через жасмонат-зависимый сигнальный путь (Jiang et al., 2020). В общей сложности обнаружено до 363 малых РНК дифференциально экспрессирующихся в геноме кукурузы в ответ на инокуляцию штаммом FZB42 в сравнении с мутантами FZB42ΔsfpΔalss с подавленным синтезом сурфактина и не способными запускать фитозащитную реакцию, среди которых четыре микроРНК (zma-miR169a-5p,

zma-miR169c-5p, zma-miR169i-5p и zma-miR395b-5p), были выбраны в качестве ассоциированных с устойчивостью кандидатов микроРНК (Kang et al., 2021). Относительно целевого использования штаммов бактерий рода *Bacillus*, в качестве дцРНК генерирующих систем пока известно мало. Многие эндофиты также способны давать дополнительные преимущества хозяевам, включая устойчивость к вредителям и патогенам за счет производства антибиотиков, антимикотических и антифидатных белков и метаболитов (Максимов и др., 2020; Максимов и др., 2022).

Потенциалом для исследований может быть также оценка работы РНКи в условиях формирования многоуровневого растительного метабиома, состоящего как минимум из растения и патогена и/или эндофита и/или симбионта. Поскольку феномен РНКи присущ всем эукариотам, следует ожидать, что при формировании тесных, в особенности паразитических и/или симбионтных отношений, этот защитный для отдельного организма, казалось бы, механизм отключения генов вступает во взаимодействие с подобным другого организма. С одной стороны, так как РНКи является естественным явлением, связанным с комплементарностью остатков нуклеиновых кислот, и эффективно работает во всех таксонах живых организмов, можно полагать, что фитопатогены не способны легко преодолевать данную защиту. С другой, поскольку при использовании экзогенных дцРНК целевые эффекты достигаются без изменения структуры генома хозяина, на них не должны распространяться правовые ограничения, связанные с ГМО. Правда, это не снимает вопросов перспективности и безопасности использования такого экономически выгодного подхода для укрепления устойчивости к вирусам, патогенам и вредителям, поскольку потенциал и безопасность метода аппликаций экзогенной дцРНК слабо исследованы, не все риски известны. В отличие от других фитозащитных мероприятий, включая не только химические, но и биологические, очевидные риски для здоровья человека с помощью технологии РНКи кажутся минимальными, поскольку присутствие молекул дцРНК не способствует накоплению каких-либо белковых продуктов

и, следовательно, подход использования природного метода РНКи для «глушения» синтеза целевых белков считается более предпочтительным, по сравнению с традиционными подходами создания генно-модифицированных организмов. Данные по функционированию компонентов, участвующих в явлении РНКи позволят разработать весьма эффективные и экологически-безопасные стратегии борьбы с комплексом патогенов в агроценозе.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

Эксперименты проводились на растениях пшеницы (*T. aestivum* L.) двух контрастных по устойчивости к грибу *Stagonospora nodorum* Berk сортов: Жница (восприимчивый) и Омская 35 (устойчивый). Кроме того, в работе частично использовали сорта Тулайковская 10, Салават Юлаев и Экада. Семена для проведения данного исследования были любезно предоставлены нам из коллекций Федерального исследовательского центра Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (Санкт-Петербург), а также Чишминского селекционного центра по растениеводству и плодово-ягодным культурам Башкирского научно-исследовательского института сельского хозяйства – обособленного структурного подразделения ФГБУН Уфимский исследовательский центр Российской академии наук.

2.2. Бактерии рода *Bacillus*

В экспериментах использовали штамм *Bacillus subtilis* 26Д, выделенный из коммерческого биопрепарата Фитоспорин–М (Башинком, Россия), выращенный в чашках Петри на питательной агаризированной среде LB в течение трех суток в термостате ES-20 (Biosan, Латвия) при 28°C. Суточную суспензию бактерий в жидкой питательной среде получали с использованием миксера LS 110 (ЛЮиП, Россия) при температуре 37°C. Штамм поддерживается и хранится в коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН.

2.3 Условия проведения опыта

Опыты проводили в лабораторных условиях, где растения выращивали при комнатной температуре (20-22° С) на светоплощадке с 16-ти часовым светопериодом и освещенностью 12-16 тыс. лк (лампы ЛД-4, ЛБ-40).

Семена пшеницы перед проведением экспериментов стерилизовали 80%-ным этанолом (1 мин) и несколько раз промывали стерильной водой.

Далее, семена проращивали в эмалированных кюветах на влажной фильтровальной бумаге. Посуду и бумагу автоклавировали при температуре 150-180°C в течение 1,5-2 часов (Полевой и др., 2001). Полностью развернутые первые листья 7-суточных проростков срезали и помещали в чашки Петри на влажную вату с добавлением бензимидазола (40 мг/л).

Предварительное предпосевное замачивание семян производили водными растворами СК, ЖК, а также бактериальной суспензией штамма *B. subtilis* 26Д. Конечные концентрации растворов, использованных в большинстве экспериментов (СК - 10^{-5} М и ЖК - 10^{-7} М, а также суспензия бактерий *Bacillus* spp. - 10^8 кл./мл) были выбраны исходя из ранее полученных результатов о влиянии растворов СК и ЖК на устойчивость пшеницы к возбудителю септориоза как наиболее эффективные в индуцировании устойчивости против *S. nodorum* (Яруллина и др., 2011; Бурханова и др. 2017).

2.4 Методы работы с фитопатогеном

2.4.1 Фитопатогенный гриб *Stagonospora nodorum* Berk

Грибы рода *Septoria*, относящиеся к классу *Deuteromycetes*, порядок *Sphaeropsidales*, вызывают септориоз (Пыжикова, Карасева, 1986). Симптомы поражения: некрозы, пятнистости, усыхания, образование на зараженных частях растений многочисленных пикнид. На пшенице паразитирует от 10 до 15 видов грибов рода *Septoria*, из которых особенно вредоносным является гриб *Stagonospora nodorum* Berk (Санина, Анциферова, 1989). Для оценки экспрессионной активности генов системы РНК-интерференции в эксперименте использовали высоковирулентный в отношении мягкой пшеницы *T. aestivum* штамм фитопатогенного гриба *Stagonospora nodorum* - SnB. Этот штамм хранится в коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН.

Для оценки активности генов системы РНКи у гриба *S. nodorum* вне патосистемы, патоген культивировали на жидкой картофельно-глюкозной питательной среде в чашках Петри. Для этого суспензию спор гриба в

концентрации 10^5 спор/мл вносили в питательную среду и затем культивировали в климато-камере KBW E6 (Binder GmbH, Germany) при температуре 18°C в течение 14 суток при периодическом 16-ти часовом освещении. В экспериментальные варианты питательных сред предварительно добавляли растворы СК с конечными концентрациями 10^{-4} , 10^{-5} и 10^{-6} М, а также ЖК - 10^{-5} , 10^{-6} и 10^{-7} М соответственно.

2.4.2 Инфицирование растений

Инфицирование проростков пикноспорами гриба *S. nodorum* проводили путем нанесения на лист микропипеткой суспензии спор в концентрации 10^5 спор/мл одной микрокаплей объемом 4-5 мкл на лист (Максимов и др., 2013). Инокулированные патогеном листья выдерживали при комнатной температуре в темноте в течение 24 часов, после чего переносили на светоплощадку с фотопериодом 16 ч/сут.

2.4.3 Визуальная оценка степени поражения растений пшеницы

Наблюдение за развитием патогенного гриба *S. nodorum* Berk в лабораторных условиях проводили ежедневно. Степень поражения растений и проявления симптомов септориоза оценивали по 4-бальной системе, разработанной во Всероссийском НИИ фитопатологии (Пыжикова, Карасева, 1986). На отрезках листьев симптомы болезни проявлялись на 4-5-й сутки после инфицирования в виде пятен эллиптической формы от светло-коричневого до бурого цвета, окруженных желтым некрозом. Образование пикнид наблюдалось на 7-20-й день после инокуляции. Граница бурого пятна на восприимчивых сортах проявлялась не четко, а некротическая зона постепенно переходила от желтого к зеленому, что соответствовало 4-ому баллу развития болезни. На устойчивых сортах увеличение некротического пятна начиналось на 5-10 дней позже и бурое пятно было темноватым, а некротическое – узким и четко ограниченным. Определение площади под кривой развития болезни проводили согласно методике, предложенной

Марченковой с соавт. (Марченкова и др., 1991). Площадь зоны поражения на отрезках листьев измеряли с помощью программы ImageJ (rsbweb.nih.gov/ij/download.html).

2.5 Подбор олигонуклеотидных последовательностей и построение филогенетических деревьев

Биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием известных генетических баз данных, в частности, NCBI и FunRNA.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров для оценки активности транскрипции генов системы РНК-интерференции у мягкой пшеницы

Белок/ Ген	Номер из GenBank	Нуклеотидная последовательность
Ингибитор РНКаз / <i>TaRLI(a)</i>	AY059462	F: TTGAGCAACTCATGGACCAG
		R: GCTTTCCAAGGCACAAACAT
AGO1/ <i>TaAGO1</i>	JQ805149.1	F: ATCAGCCTCCAGTTACSTTTG
		R: GCAGTATGTTCCCGCTTCTAT
AGO2/ <i>TaAGO2</i>	KY794780.1	F: CTTTCATCGGCTGTTGCTTATG
		R: GAACGAACTCTGACACGGAATA
AGO4/ <i>TaAGO4</i>	JQ805150.1	F: CTCCAGGCACTGTTGTAGATAAT
		R: AGTGTGTTGGCCTTGTAGTC
DCL2/ <i>TaDCL2</i>	KY794782.1	F: CGAATCGTCGAACTGGAGAAT
		R: ATCTCGTAGTGGCAAATGG
DCL4/ <i>TaDCL4</i>	KY794783.1	F: CTTCACTGGGTGGGAATAGATG
		R: GGTGTGGTTCGTGAGAGATAAA

На основе полученных данных, выбрали праймеры для исследований по анализу активности транскрипции генов *DCL* и *AGO* мягкой пшеницы в

норме и в условиях инфицирования растений фитопатогенным грибом *Stagonospora nodorum*. С использованием базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) для оценки активности транскрипции были подобраны праймеры к генам системы РНКи пшеницы (табл. 1).

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров для оценки активности транскрипции генов системы РНК-интерференции у патогенного гриба *S. nodorum* Berk.

Локус	Обозначение гена	Нуклеотидная последовательность
S56922.1	<i>SnTub(β)</i>	F: TGGTATGGGTACGCTTTTGATCTC
		R: GTAGCGACCGTTGCGGAAGTCAGA
Snog_10566	<i>SnAGO1</i>	F: ATGGGAATTGGAAGAGGAAGAG
		R: GAGGTAGTTGGTAGCGAAAGAG
Snog_12157		F: GCAAGTTCGCCATGAACAATAA
		R: CAAACCTTCTGGACCATCTCTC
Snog_10421	<i>SnAGO2</i>	F: TTCTACAGGGACGGTGTATCT
		R: CTCTTTGTCTCCAAGGCCTATC
Snog_10544		F: GGAGACTCACAGTTCGAAGAAG
		R: TAGGAGAGGCAGAGGTTGTAA
Snog_10546	<i>SnAGO3</i>	F: CGTTTCCTGGGTTGACATAGAT
		R: GCCAGACGTTCACTCTGATATT
Snog_06565	<i>SnAGO18</i>	F: CGTCATACTACCAAGCGACAA
		R: GATGGGTGAGTGACATCGATAC
Snog_12309		F: GTCAGTCGATCAAGGTGGATTTA
		R: CGTATAGTGCTGACGTCTCTTG
Snog_08521	<i>SnDCL1</i>	F: GGTCTGAAGAAGACCGAAGAAG
		R: CTTGGTGTAGGCAGCATAGTAG

Праймеры к генам РНКи у возбудителя септориоза были подобраны с использованием базы данных FunRNA (<http://funrna.riceblast.snu.ac.kr>) (табл. 2). Для подбора праймеров использовали открытые интернет-ресурсы «Primer-Blast» (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) и «PrimerQuest Tool» (<https://eu.idtdna.com/Primerquest>).

Таблица 3. Нуклеотидные последовательности праймеров к гену *TaAGO1*, использованные для препаративного выделения амплифицированного фрагмента и секвенирования ДНК/кДНК

Ген (условное обозначение)	Нуклеотидная последовательность	Размер фрагмента
<i>TaAGO1</i> (A1)	F: GTGAAGAAGCAGAGACGTAAGA	552
	R: GGTAATGGCCCAGCTGTATAA	
<i>TaAGO1</i> (A2)	F: ATGTGACCATAACGCCAGAG	815
	R: AGGTAAAGTGGTGTGCTGAATA	
<i>TaAGO1</i> (A3)	F: CCTGTTGATGATCGTGGTACTG	954
	R: TCCAGGGTGAGGATGTGTAA	
<i>TaAGO1</i> (A4)	F: TGTGAGACTGAACTTGGATTGG	882
	R: GGCTGCCAGATGTGCATAATA	
<i>TaAGO1</i> (A5)	F: TGTTGATAGAAGCGGGAACATAC	679
	R: CTTCTCGCAGCACCATATAA	

Кроме того, при помощи указанных выше инструментов и баз данных мы подобрали ряд перекрывающихся праймеров к гену *TaAGO1*, размером не более 1000 п.н., предварительно проверив их специфичность и отжиг на хромосомах *T. aestivum* при помощи базы данных «Ensembl Plants» (URL: <http://plants.ensembl.org>) для последующего секвенирования полученных ампликонов и оценки роли геномной составляющей в реализации явления

РНКи в растениях пшеницы в условиях инфицирования возбудителем септориоза (табл. 3).

2.6 Молекулярно-биологические методы

2.6.1 Выделение и очистка РНК из растений

Выделение суммарной РНК для оценки уровня транскриптов исследуемых генов проводили с использованием реагента «Тризол» (“Molecular Research Center, Inc.”, США), согласно протоколу фирмы-поставщика. Для этого проростки растений растирали в жидком азоте до гомогенного состояния. К полученному объему добавляли 10 объемов данного реагента и тщательно гомогенизировали. Затем центрифугировали при 10000 об/мин в течение 20 минут при +4°C. Водную фазу переносили в чистую пробирку с равным объемом водонасыщенного хлороформа, вновь тщательно перемешивали и центрифугировали при тех же условиях. На последнем этапе выделения добавляли изопропанол и оставляли при -20°C минимум на один час для формирования осадка РНК. Перед использованием РНК осаждали центрифугированием, промывали 70%-ным этанолом и растворяли в минимальном количестве дистиллированной воды. Все процедуры с РНК проводили при +4°C. Концентрацию нуклеиновых кислот измеряли на спектрофотометре (ND1000WOC) Thermo Scientific™ NanoDrop™ 1000 при A_{260}/A_{280} .

2.6.2 Выделение и очистка ДНК из растений

ДНК из листьев растений для последующего секвенирования выделяли фенольно-детергентным методом (Маниатис, 1984). Семена перед проращиванием предварительно обрабатывали 70%-ным этанолом для исключения экзогенной микрофлоры. Затем растительный материал растирали в жидком азоте до порошкообразного состояния и к нему добавляли 5 - 10 объемов (по отношению к исходной навеске растительного материала) экстрагента, содержащего 100 мМ трис-НСl (рН 8.0), 20 мМ ЭДТА, 1%-ный

ДДС натрия, и прогревали на водяной бане при 60⁰С в течение 10 мин. Охладив суспензию до комнатной температуры, добавляли 5 М NaClO₄ до конечной концентрации 1 М. Экстракцию ДНК и ее одновременную депротеинизацию осуществляли, встряхивая гомогенат с равным объемом (по отношению ко всему объему гомогената) смеси 80%-ного свежеперегнанного фенола (доведенного до рН 8.0 с помощью многократных насыщающих встряхиваний с трис-НСl, рН 8.0), хлороформа и изоамилового спирта, взятых в соотношении 25:24:1, в течение 40 - 60 мин на встряхивателе типа 358S (Erap, Польша). Смесь расслаивали центрифугированием при 1000 об/мин в течение 20 мин в препаративной центрифуге типа 5415R Eppendorf (Германия). Верхний водно-солевой слой, содержащий нуклеиновые кислоты, отбирали пипеткой и повторно депротеинизировали в течение 20 мин. Затем смесь центрифугировали и ДНК осаждали, перенося водно-солевую фазу в центрифужный стакан с двумя объемами охлажденного 96%-ного этанола. Спиртовой осадок ДНК собирали центрифугированием, промывали 70%-ным этанолом для удаления следов фенола, подсушивали и растворяли в минимальном объеме 1 x TE буфера.

2.6.3 Реакция от-ПЦР и полуколичественный анализ экспрессии гена

Для синтеза кДНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием M-MuLV обратной транскриптазы (“Синтол”, Россия). Обратнo-транскрипционную ПЦР (от-ПЦР) на основе мРНК исследуемых генов системы РНКи пшеницы и патогена осуществляли в 20 мкл общего объема смеси, содержащей 10μg выделенного пула общей РНК, 1 μl M-MuLV обратной транскриптазы (Fermentas, Литва), 9 μl буфера для обратной транскрипции, 32 mM MgCl₂, 1 μl олигонуклеотидных праймеров, по 5 μl 1,25 mM dNTP. При этом отжиг олигонуклеотидных праймеров на матрице мРНК проводили в течение 5 мин при 65⁰С и построение кДНК по матрице мРНК в течение часа при 37⁰С. Полученную одноцепочечную кДНК использовали в

реакции амплификации с соответствующими праймерами. Для от-ПЦР эмпирически подбирались температура отжига и количество циклов в экспоненциальной фазе амплификации.

2.6.4 Полимеразная цепная реакция ДНК

ПЦР проводили в амплификаторе типа ТП4-ПЦР-01-«Терцик» (ДНК-технология, Россия) следующим образом: начальная денатурация -94°C, 2 мин; 25-35 циклов амплификации: 1) денатурация -94°C, 30 сек; 2) отжиг – от 55 до 65°C, 1 мин; 3) элонгация -72°C, 30 сек; достраивание цепей ДНК -72°C в течении 5 минут. Реакция проводилась в 30 мкл общего объема смеси, содержащей 67 мМ трис-НСl, 15 мМ (NH₄)₂SO₄, 2 мМ MgCl₂, 0,1 мкг геномной ДНК, по 2пМ каждого праймера, по 200 мкМ дАТФ, дЦТФ, дТТФ, дГТФ и 1 е.а. *Taq*-полимеразы. После амплификации 10 мкл реакционной смеси фракционировали методом электрофореза.

Оценка числа копий транскриптов для каждого исследуемого гена определяли методом количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе «CFX Connect Real-Time System» («Bio-Rad», США) с использованием интеркалирующих красителей SYBR Blue и EVA-Green («Синтол», Россия) с помощью программного обеспечения «Bio-Rad CFX Maestro 1.1 Version: 4.1.2433.1219» («Bio-Rad», США) относительного референсных генов домашнего хозяйства: *TaRLI*, кодирующего белок подобный ингибитору РНКазы-L (RNase L inhibitor-like protein) у пшеницы и *SnTub(β)* у патогенного гриба *S. nodorum*.

2.6.5 Электрофоретический анализ формирования ампликонов

Электрофорез полученных ампликонов проводили в 8%-ном полиакриламидном геле в электрофоретической камере Mini-Protean II Electrophoretic St-II («Bio-Rad», США). Источниками питания служил прибор Эльф-8 фирмы ДНК-Технология (Россия). В качестве буферной системы

использовали TAE-буфер, содержащий 40 мМ трис-ацетата (рН 7.6) и 2 мМ ЭДТА.

При разделении фрагментов ДНК электрофорез проводили при напряжении 120 Вв течение 30 минут. Гели после окрашивания в 0.5%-ном растворе этидия бромида фотодокументировали на системе «GelDoc Go Imaging System» («Bio-Rad», США).

2.7 Статистическая обработка результатов

Измерения активности транскрипции исследуемых генов проводили в 3-х биологических и 3-х аналитических повторностях. Статистическую обработку данных ПЦР в реальном времени проводили с помощью программного обеспечения «Bio-Rad CFX Maestro 1.1 Version: 4.1.2433.1219» (Bio-Rad, США), а также с использованием программы «Microsoft Excel» (Microsoft, США) и «Statistica» (StatSoft, Россия). Данные гель-электрофореза обрабатывали с помощью программы «TotalLab v2.01» (Newcastle-Upon-Tyne, UK). Площадь зоны поражения на отрезках листьев измеряли с помощью компьютерной программы «ImageJ» (rsbweb.nih.gov/ij/download.html).

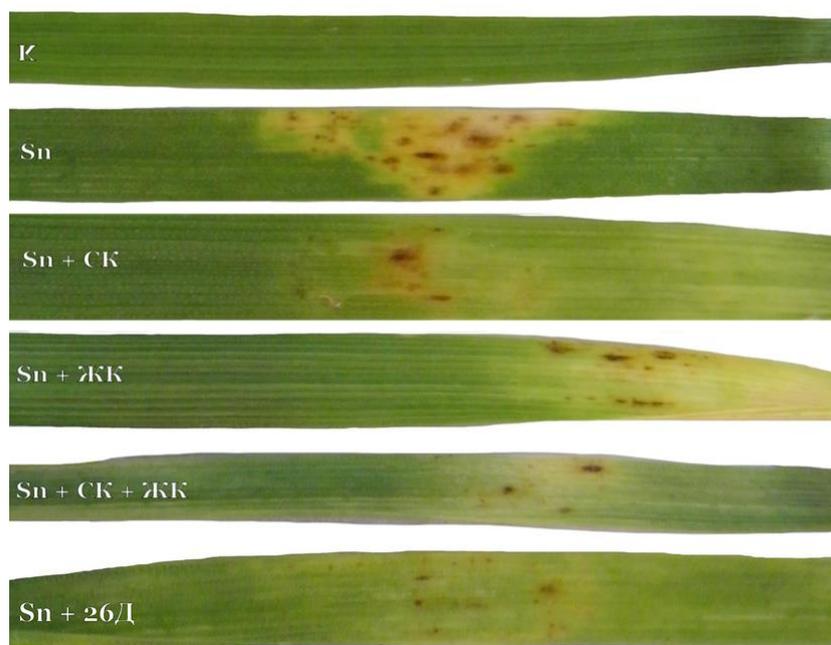
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Динамика роста патогенного гриба *S. nodorum* у контрастных по устойчивости сортов мягкой пшеницы

Оценка зоны поражения листьев грибным патогеном выявила высокую интенсивность формирования инфекционного пятна и быстрое развитие некрозов в листьях восприимчивого сорта Жница, что свидетельствует о высокой степени его поражаемости патогеном. В то же время на устойчивом сорте Омская 35 болезнь развивалась менее интенсивно (Рис. 2). Ранее в лаборатории была проведена оценка влияния обработки семян пшеницы СК и ЖК на последующее формирование у проростков устойчивости к грибу *S. nodorum* (Бурханова и др. 2017). Эти работы показали, что использованные концентрации индукторов устойчивости позволяют значительно снизить степень развития болезни на листьях. Соответственно, в ходе эксперимента были подтверждены характерные для исследуемых сортов особенности по устойчивости к *S. nodorum*: на 7 сутки после инфицирования листа сорта Жница были в значительной степени поражены, в то время как у сорта Омская площадь поражения была значительно меньше, особенно в случае предварительной обработки СК, ЖК и их композицией (Рис.2).

Следует отметить, что успешное развитие гриба в тканях растений сопровождается накоплением его биомассы и, соответственно, изменением в соотношении белков и нуклеиновых кислот между хозяином и его патогеном [Poveda et al., 2022]. Основываясь на этом, мы провели анализ соотношения уровня транскриптов референсных генов мягкой пшеницы *TaRLI* и грибного патогена *S. nodorum SnTUB* в экспериментальных растениях с использованием метода количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе «CFX Connect Real-Time System» («Bio-Rad», США) с использованием интеркалирующего красителя EVA-Green (Синтол, Россия) (Рис. 3).

(а) Жница



(б) Омская 35

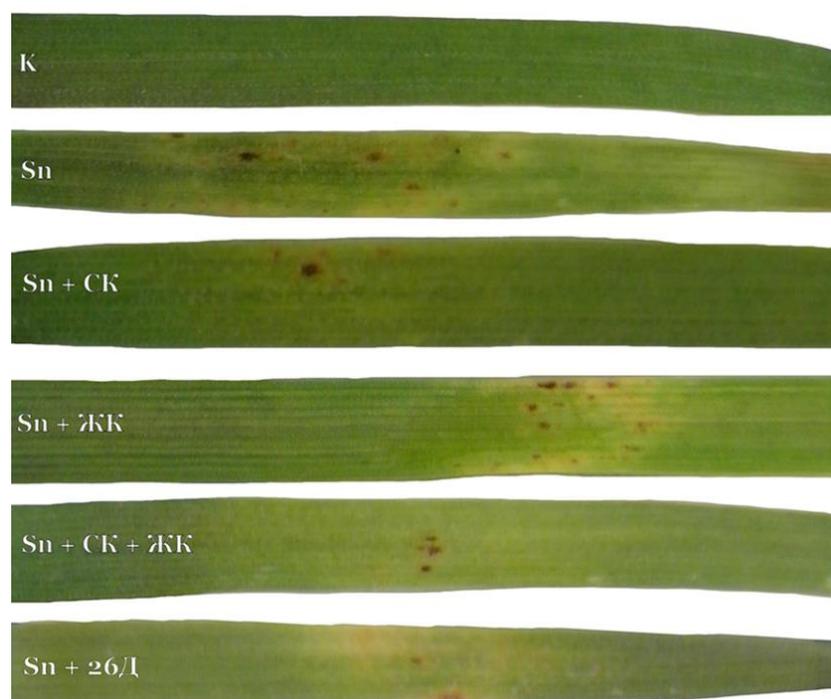


Рисунок 2. Отрезки листьев растений пшеницы восприимчивого (а) и устойчивого (б) сортов пшеницы в нормальных условиях (К), в условиях инфицирования спорами гриба *S. nodorum* (Sn) и после предварительной обработки семян салициловой (Sn + СК) и жасмоновой (Sn + ЖК) кислотами, а также их композицией (Sn + СК + ЖК) и бактериальным штаммом *B. subtilis* 26Д (Sn + 26Д) на 7 сутки после поражения патогеном

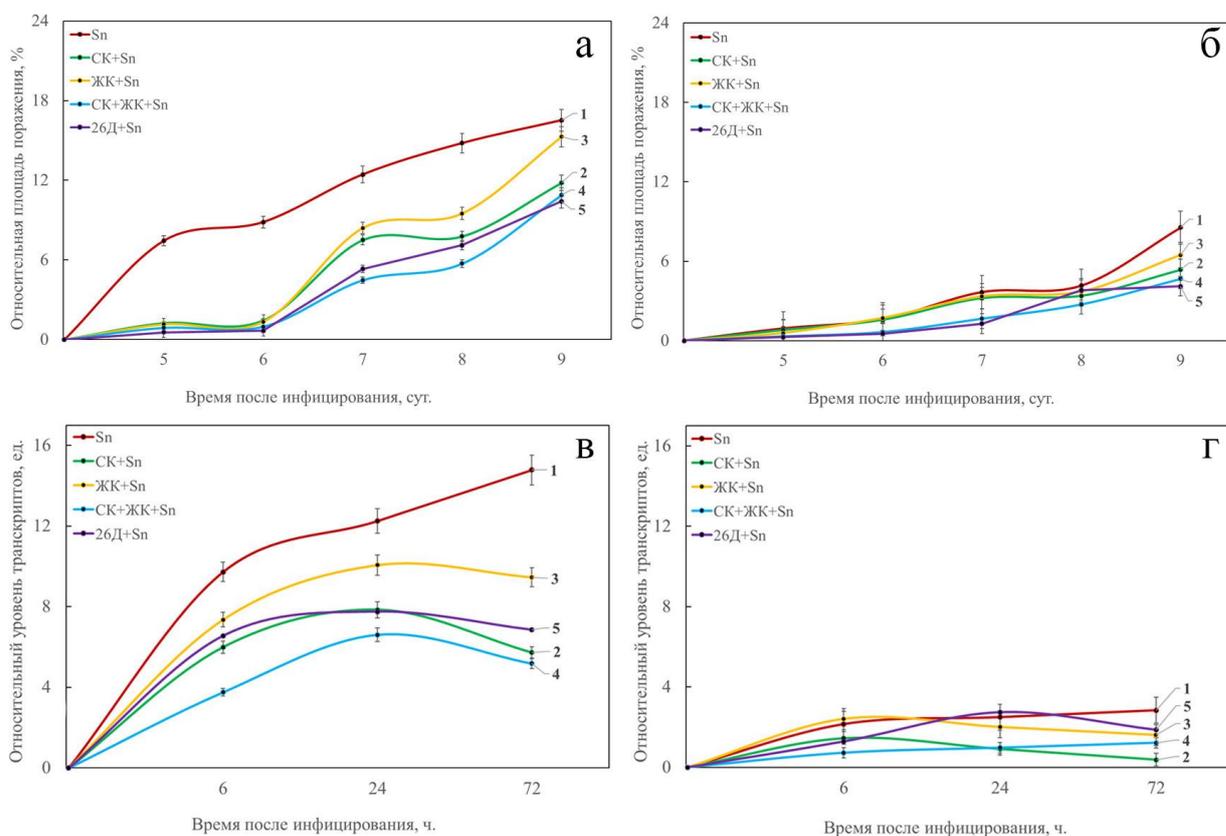


Рисунок 3. Сравнительные показатели площади поражения проростков пшеницы септориозом (а, б) и уровня активности транскрипции гена *SnTUB* гриба *S. nodorum* по отношению к гену *TaRLI* мягкой пшеницы (в, г) в листьях восприимчивого (а, в) и устойчивого (б, г) сортов мягкой пшеницы в норме (1) и после предварительной обработки салициловой (2), жасмоновой (3), кислотами, их композицией (4) и бактериальным штаммом *B. subtilis* 26Д (5)

Как видно из данного рисунка (рис. 3), соотношение уровня активности транскрипции гена *SnTUB* гриба *S. nodorum* к сходному показателю гена *TaRLI* пшеницы у восприимчивого сорта Жница в течение наблюдаемого периода было намного выше, чем у устойчивого сорта Омская 35. Причем, оно было ниже на растениях предварительно обработанных СК и ЖК, а также их композицией. Точно также предобработка этими индукторами устойчивости снижала соотношение *SnTUB/TaRLI* и у устойчивого сорта Омская 35. Таким образом, на основе полученных нами данных можно сделать заключение о том, что показатель соотношения уровней активности транскрипции генов *SnTUB/TaRLI* является удобным критерием для оценки устойчивости

различных сортов пшеницы к септориозу, а также оценки воздействия на растения индукторов различной природы при формировании взаимоотношений между хозяином и его патогеном. Кроме того, наблюдаемые сорт-специфичные особенности активности транскрипции референсных генов свидетельствуют о применимости показателя соотношения *SnTUB/TaRLI* при молекулярно-биологической оценке развития гриба в тканях листьев пшеницы.

3.2 Активность транскрипции генов системы РНКи у растений пшеницы в условиях инфицирования грибом *S. nodorum* предварительной инокуляции семян салициловой и жасмоновой кислотами

Из литературных данных известно, что *TaAGO1* и *TaDCL4* (Xie et al., 2005) активно экспрессируются в ходе инфицирования растения хозяина вирусами и грибными патогенами, а также играют ключевую роль в биогенезе малых РНК (Dalmau et al. 2000; de Alba et al. 2013). Поэтому на начальном этапе исследования для проверки работоспособности полученных нами праймеров, а также для подбора оптимальных условий проведения реакции, методом ПЦР нами были синтезированы копии фрагментов исследуемых генов *TaAGO1* и *TaDCL4* на устойчивом к патогену *S. nodorum* сорте Омская 35 и восприимчивом сорте Жница. Полученные изображения анализировали в программе TotalLab v2.01 (Newcastle-Upon-Tyne, UK) для определения уровня накопления транскриптов анализируемых генов. Данные сравнивали с данными ПЦР в реальном времени для оценки объективности конечных результатов (Рис. 4).

Установлено, что у растений пшеницы восприимчивого сорта Жница через 6 часов после инфицирования наблюдается выраженная активация транскрипции гена *TaAGO1*, а также менее выраженное накопление транскриптов гена *TaDCL4*. Через 24 часа после инфицирования наблюдалось снижение активности транскрипции гена *TaAGO1*, однако у инфицированного

образца уровень транскриптов данного гена оставался выше, по сравнению с контрольным образцом, что предполагает транзитную активацию гена *TaAGO1* у восприимчивого сорта пшеницы в течение 1-х суток после инфицирования.

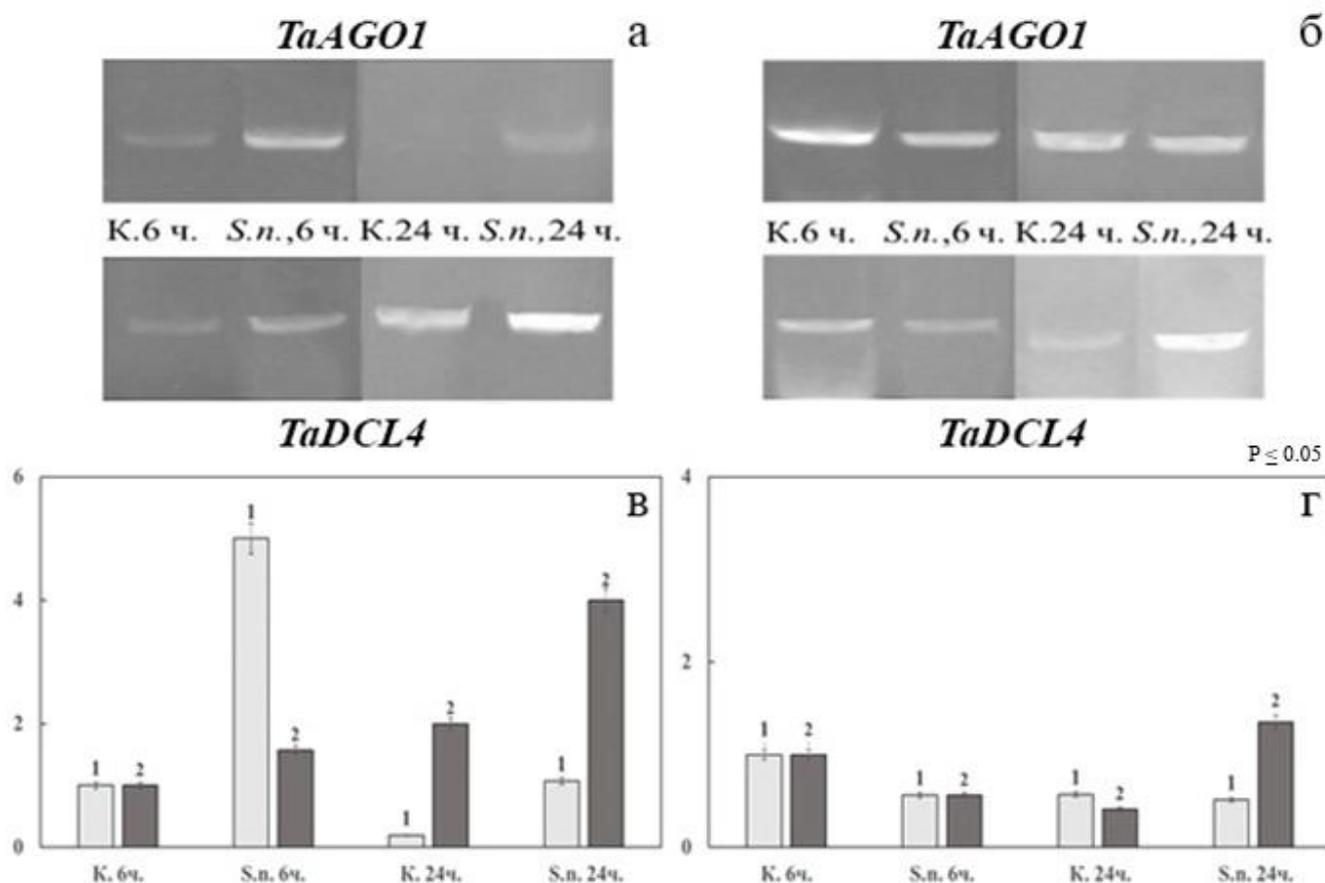


Рисунок 4. Активность транскрипции генов *TaAGO1* (1) и *TaDCL4* (2) у восприимчивого сорта Жница (а, в) и устойчивого сорта Омская 35 (б, г) по результатам анализа электрофореза и ПЦР в реальном времени

Вместе с тем, у устойчивого сорта пшеницы Омская 35 наблюдалась менее выраженная активация транскрипции гена *TaDCL4* через 24 часа после инфицирования, в то время как активность транскрипции гена *TaAGO1* сохранялась на уровне контрольных образцов. Ранее нами было показано, что при инфицировании возбудителем септориоза, активность транскрипции генов *TaAGO1* и *TaDCL4* повышалась у устойчивого сорта пшеницы Тулайковская 108 и сохранялась на уровне контрольных значений у

средневосприимчивого сорта пшеницы Салават Юлаев (Shein et al., 2021(A)). С учетом динамики развития заболевания (рис.2; рис.3), можно полагать, что подобные различия в активности транскрипции исследуемых генов у сортов пшеницы Жница и Омская 35 в данном опыте обусловлены различным ответом на инфицирование, а также активацией ряда других генов при формировании иммунного ответа (Шейн и др., 2019).

Известно, что важную роль в формировании защитного ответа растений против патогенов играют фитогормоны, к числу которых относятся СК и ЖК (Pieterse et al., 2012). Вместе с тем, данные о совместной работе этих индукторов остаются противоречивыми. Имеются данные об антагонистических отношениях СК и ЖК (Van der Does et al., 2013). В тоже время в работе Halim с сотрудниками (2009) показано, что у картофеля СК и ЖК могут действовать совместно. В целом можно сказать, что СК активировать устойчивость хозяина к биотрофным патогенам, тогда как ЖК имеет решающее значение для активации защитного ответа против растительноядных насекомых и некротрофных патогенов (Caarls et al., 2015). Стоит также отметить, что возбудитель септориоза является био-некротрофным организмом, проявляющим различные патогенные свойства на разных стадиях своего развития. Соответственно, логично предположить, что на различных стадиях заболевания и в зависимости от динамики ее протекания в разное время могут активироваться как работающая против биотрофов СК, так и работающая против некротрофов ЖК.

Учитывая указанные особенности патогенного гриба *S. nodorum*, влияние СК и ЖК на активность генов системы РНКи при поражении растения возбудителем септориоза представляет большой интерес. Ранее в лаборатории была проведена оценка влияния обработки семян пшеницы СК и ЖК на последующее формирование у проростков устойчивости к грибу *S. nodorum* (Яруллина и др., 2011). Эти работы показали, что СК и ЖК позволяют значительно снизить тяжесть развития септориоза на листьях пшеницы. Поэтому, в рамках данного исследования также был проведен анализ

активности транскрипции генов растительной системы РНКи в условиях инокуляции семян растворами СК и ЖК (Рис. 5, 6, 7, 8, 9).

В результате было выявлено, что у необработанных растений восприимчивого сорта Жница наблюдалось незначительное (0.5 раз) снижение уровня транскриптов генов семейства *TaAGO* на 6-часовой точке фиксации с последующим накоплением транскриптов генов РНКи, в то время как активность этих гена у устойчивого сорта сохранялась на уровне контрольных значений (рис. 5, 6, 7). Учитывая динамику протекания заболевания и степень поражения листьев (рис. 2, 3), подобное различие у контрастных по устойчивости к *S. nodorum* сортов может объясняться различным ответом на работу РНК-интерферирующей системы патогена в процессе развития заболевания. Так, имеются данные о перемещении малых РНК патогенных грибов *Botrytis cinerea* (Jiao et al., 2018, Chen et al., 2016, Weiberg et al., 2013) и *Fusarium oxysporum* (Ji et al., 2021) в клетки хозяина для изменения экспрессии генов-мишеней, участвующих в иммунитете растений. С другой стороны, по данным работы Zhang и др. (2016), при взаимодействии между патогенным грибом *Verticillium dahliae* и растениями хлопчатника, последние могут экспортировать miR159 и miR166 в клетки грибов для запуска транскрипционной РНКи генов вирулентности.

Ранее было показано, что СК индуцировала экспрессию РНК-зависимой РНК-полимеразы 1 (RDR) у растения *A. thaliana* и способствовала повышению устойчивости к вирусу шарка сливы за счет усиления продукции киРНК (vsiRNAs) (Alamillo et al., 2006; Hunter et al., 2013; Lee et al., 2016). Известно также, что СК играет центральную роль в устойчивости организма хозяина против биотрофных патогенов, таких как *Pseudomonas syringae* и вирус морщин турнепса (Turnip crinkle virus) (Koornneef et al., 2008, Pieterse et al., 2008). В нашем опыте обработка СК транзиторно повышала у восприимчивого сорта пшеницы.

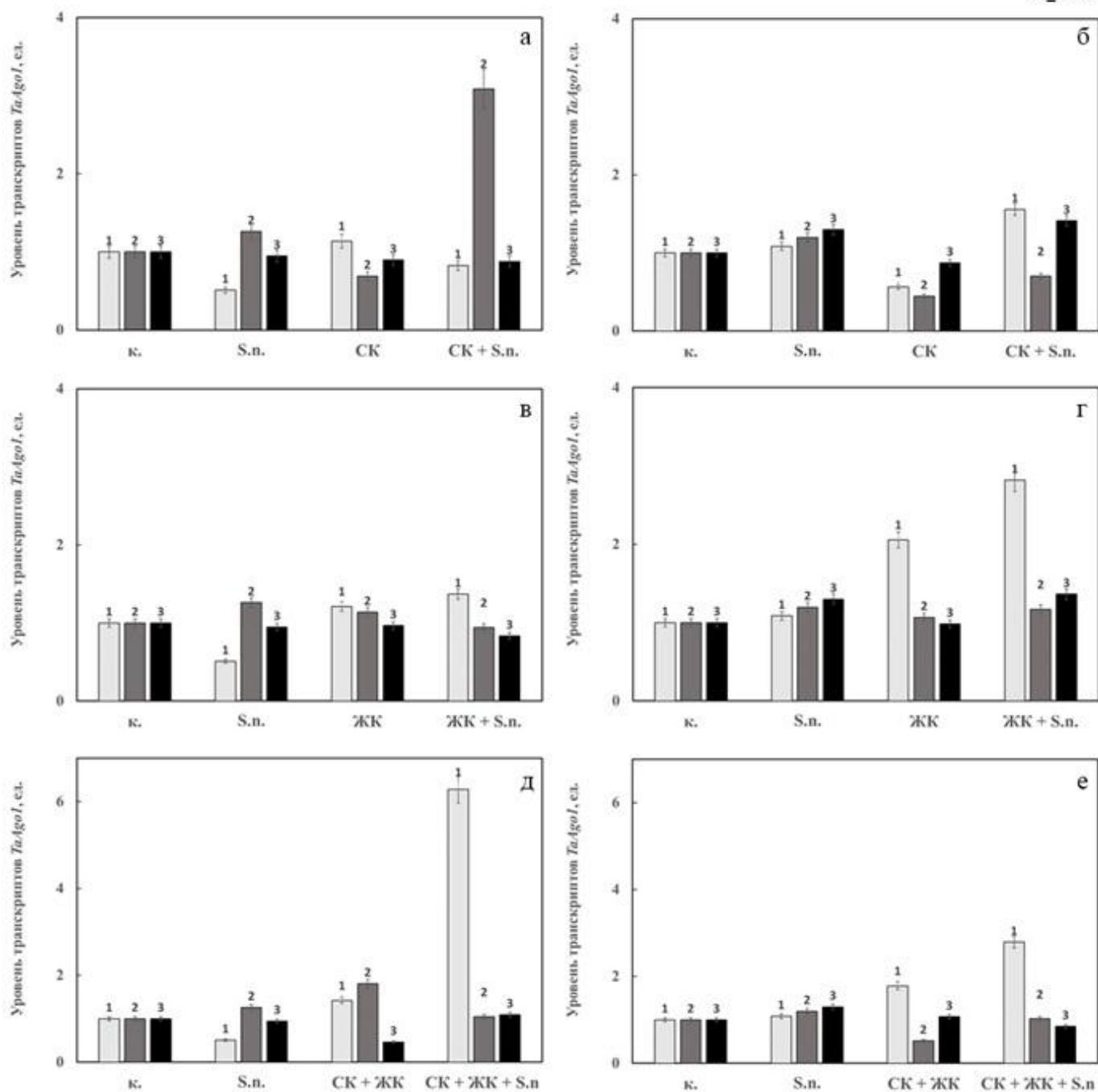


Рисунок 5. Активность транскрипции гена *TaAGO1* у контрастных по восприимчивости к *S. nodorum* сортов мягкой пшеницы Жница (а, в, д) и Омская 35 (б, г, е) при обработке семян СК (а, б), ЖК (в, г) и СК+ЖК (д, е) через 6 (1), 24 (2) и 72 (3) часа после инфицирования.

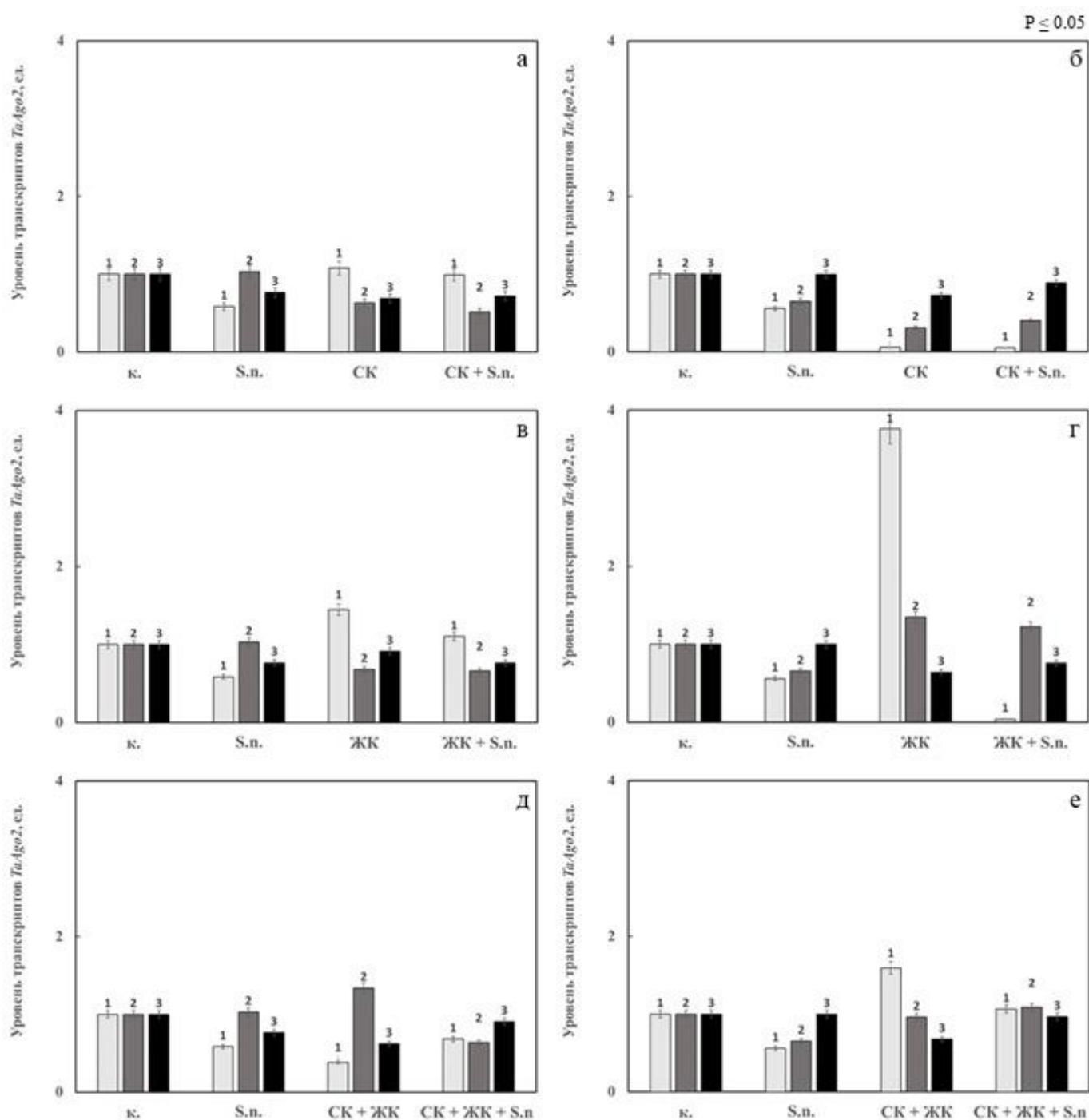


Рисунок 6. Активность транскрипции гена *TaAGO2* у контрастных по восприимчивости к *S. nodorum* сортов мягкой пшеницы Жница (а, в, д) и Омская 35 (б, г, е) при обработке семян СК (а, б), ЖК (в, г) и СК+ЖК (д, е) через 6 (1), 24 (2) и 72 (3) часа после инфицирования.

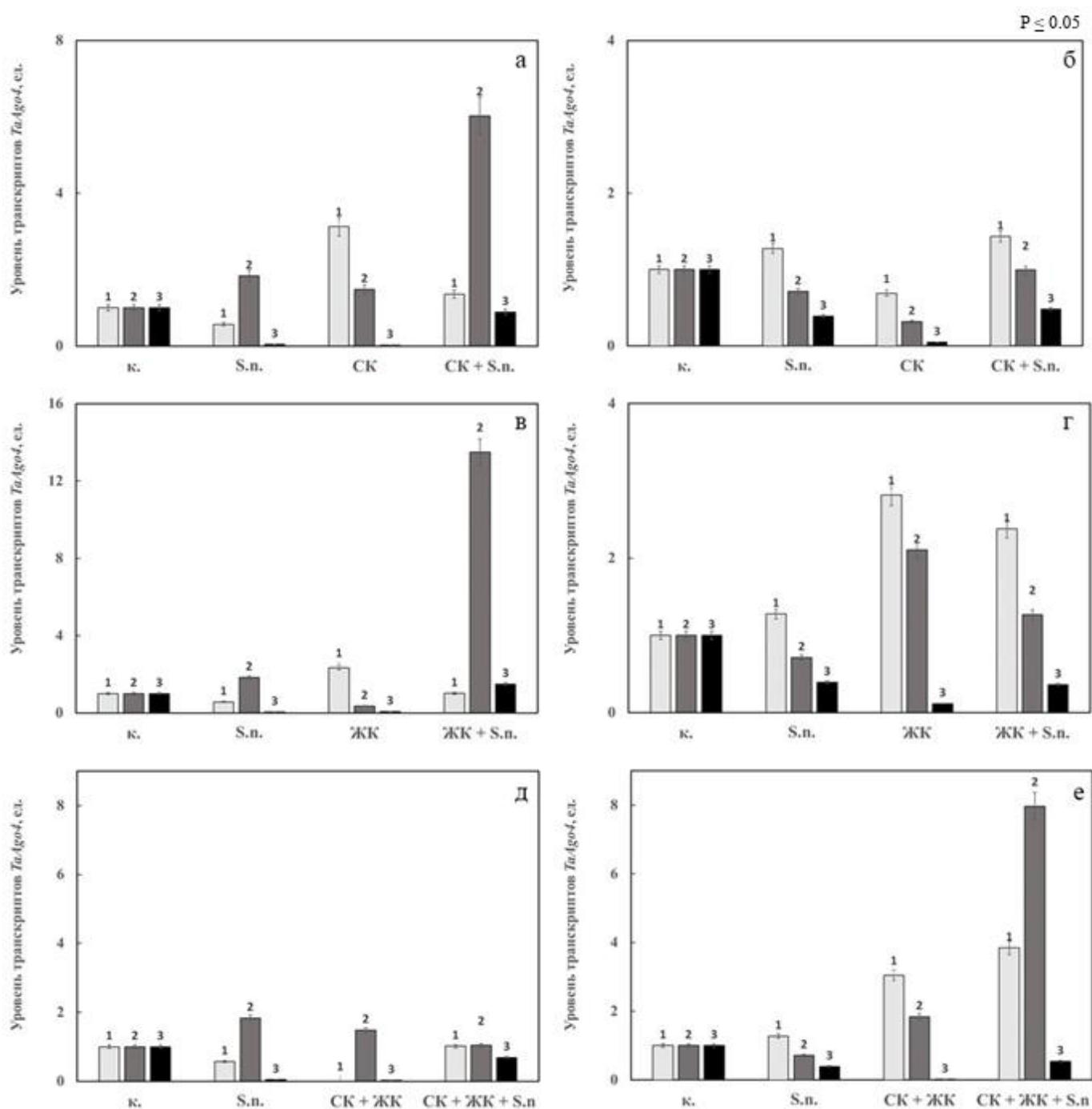


Рисунок 7. Активность транскрипции гена *TaAGO4* у контрастных по восприимчивости к *S. nodorum* сортов мягкой пшеницы Жница (а, в, д) и Омская 35 (б, г, е) при обработке семян СК (а, б), ЖК (в, г) и СК+ЖК (д, е) через 6 (1), 24 (2) и 72 (3) часа после инфицирования.

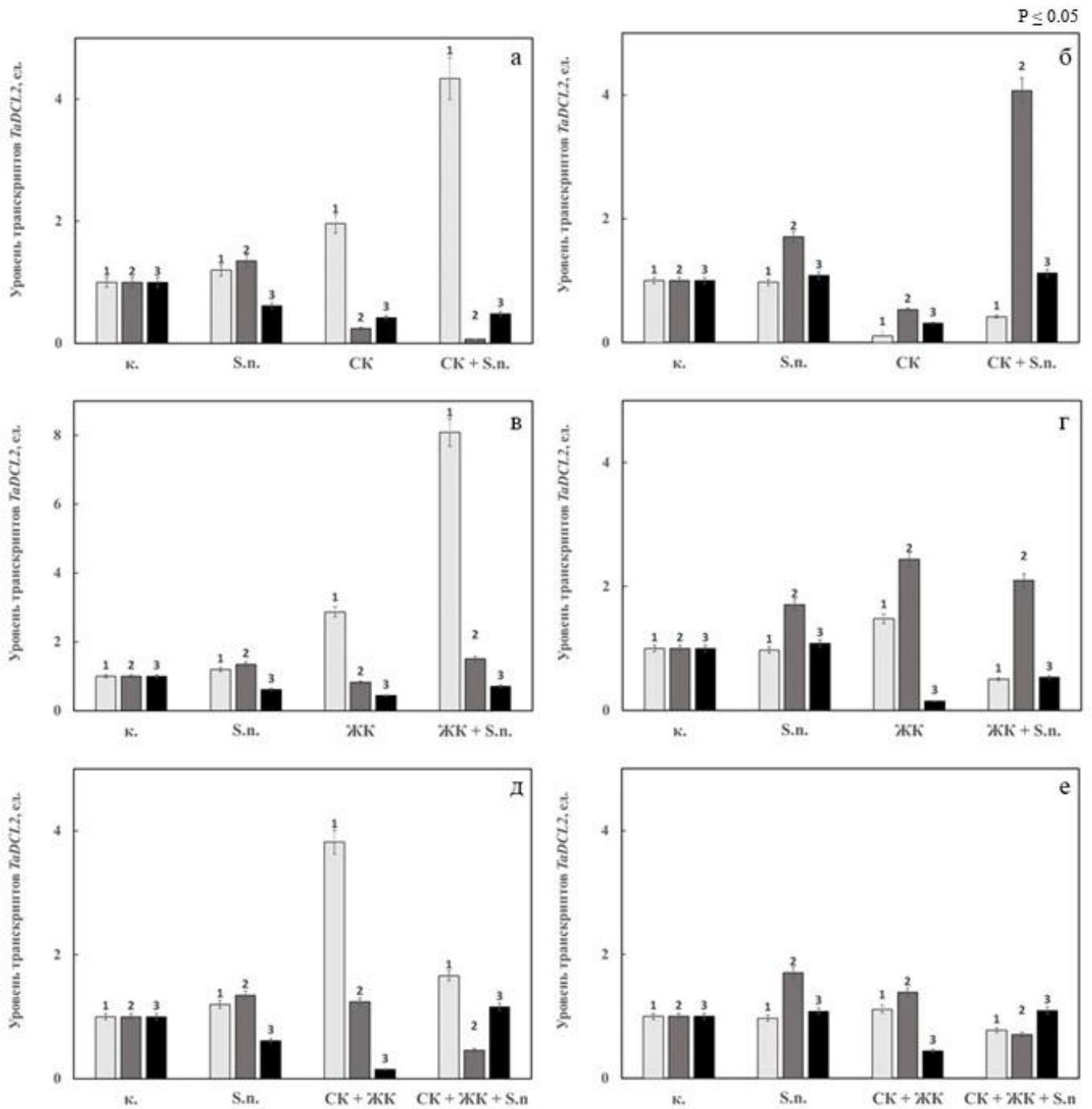


Рисунок 8. Активность транскрипции гена *TaDCL2* у контрастных по восприимчивости к *S. nodorum* сортов мягкой пшеницы Жница (а, в, д) и Омская 35 (б, г, е) при обработке семян СК (а, б), ЖК (в, г) и СК+ЖК (д, е) через 6 (1), 24 (2) и 72 (3) часа после инфицирования.

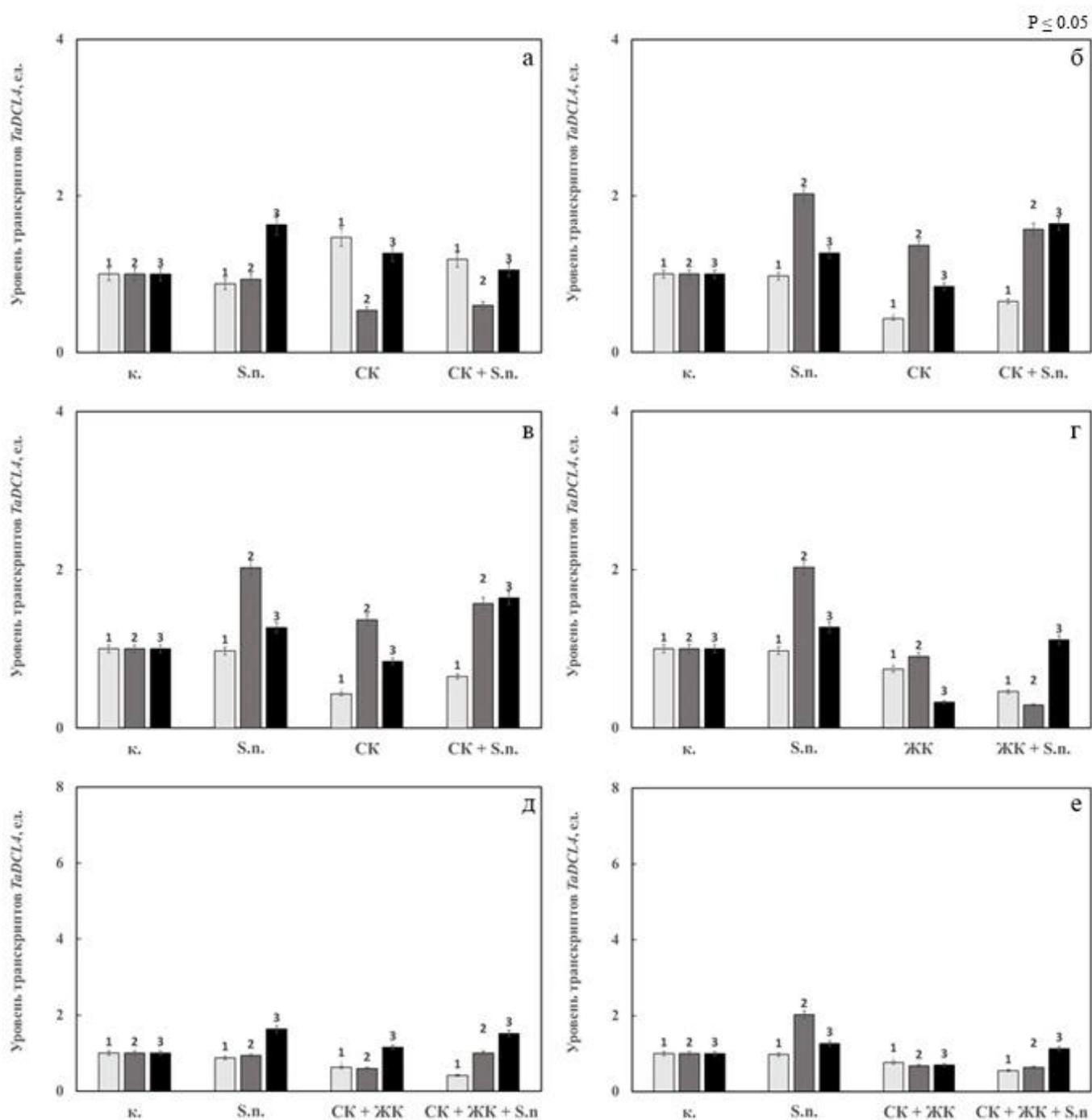


Рисунок 9. Активность транскрипции гена *TaDCL4* у контрастных по восприимчивости к *S. nodorum* сортов мягкой пшеницы Жница (а, в, д) и Омская 35 (б, г, е) при обработке семян СК (а, б), ЖК (в, г) и СК+ЖК (д, е) через 6 (1), 24 (2) и 72 (3) часа после инфицирования.

Жница в условиях инфицирования накопления транскриптов гена *TaDCL2* в 2 раза по сравнению с контрольными образцами через 6 часов и экспрессию генов *TaAGO1* в 3 раз и *TaAGO4* в 6 раз через 24 часа, соответственно. У устойчивого сорта Омская 35 продукты гена *TaDCL2* начинали активно (в 4 раза по сравнению с контролем) нарабатываться к 24-часовой точке (рис. 8), в то время как активность транскрипции гена *TaAGO1* повышалась в 1,5 раза уже к 6 часовой точке фиксации (рис. 5). Поскольку симптомы заболевания в случае предобработки СК проявлялись в меньшей степени, высокая активность генов, ответственных за явление РНКи, может свидетельствовать о регуляторном эффекте салицилатной сигнальной системы у растения-хозяина для эффективного защитного ответа.

Ранее упоминалось, что ЖК также играет важную роль в формировании защитного ответа, но против некротрофных организмов и насекомых (Нуун et al., 2008; Rosahl, Feussner, 2004). При обработке семян ЖК на восприимчивом сорте Жница активность гена *TaDCL2* повышалась на 6-часовой в 8 раз, а *TaAGO4* – в 13 раз на 24-часовой точке фиксации, что повторяло аналогичную тенденцию при обработке семян СК у данного сорта. Однако у устойчивого сорта Омская 35 наблюдалось резкое повышение активности всех трех генов семейства *AGO* уже через 6 часов как в обычных условиях, так и при поражении листа возбудителем септориоза в 2,3 – 2,8 раз по сравнению с контролем (рис. 6). Наконец, при обработке семян композицией СК и ЖК наблюдался выраженный эффект накопления транскриптов гена *TaAGO1* у обоих сортов уже через 6 часов с последующим снижением до контрольных значений: в 6 раз у восприимчивого сорта Жница и в 2,8 раз у устойчивого сорта Омская 35 (рис. 7). У сорта Омская 35 обработка смесью СК и ЖК также повышала активность гена *TaAGO4* в 3,84 раз на 6-часовой и в 8 раз на 24-часовой точках фиксации, чего не наблюдалось у восприимчивого сорта. С другой стороны, активность генов семейства *DCL* при инфицировании и совместной предобработки не менялась по сравнению с контрольными образцами у обоих сортов (Шеин и др, 2021).

3.3 Активность транскрипции генов системы РНКи у растений пшеницы в условиях инфицирования и предварительной инокуляции семян штаммом *B. subtilis* 26Д

Известно, что некоторые эндофитные бактерии обладают комплексной инсектицидной и фунгистатической активностью (Чеботарь и др., 2015; Maksimov et al., 2016), а также способностью индуцировать неспецифическую системную устойчивость растений к патогенам различного происхождения (Gimenez-Ibanez et al., 2013; Waewthongrak et al., 2014), формируя, таким образом, долговременную защиту растений, известную в научной литературе под термином праймирование (Anh et al., 2011; García-Gutiérrez et al., 2013). Ранее в нашей лаборатории уже было показано, что штамм *B. subtilis* 26Д активирует некоторые защитные системы растений пшеницы против возбудителя септориоза *S. nodorum* и индуцирует устойчивость растений пшеницы (Бурханова и др., 2017; Максимов и др., 2020). Поэтому, основываясь на литературных данных, нами была проведена оценка влияния бактериального штамма *B. subtilis* 26Д, основы биопрепарата Фитоспорин-М, на активность транскрипции генов системы РНКи пшеницы в условиях инфицирования возбудителем септориоза. На ранних этапах работы мы оценили активность транскрипции гена *TaDCL4* на обработанных данным штаммом растениях восприимчивого сорта пшеницы Жница через 24 часа после инфицирования путем анализа результатов электрофореза в полиакриламидном геле с помощью программы TotalLab (Рис. 10).

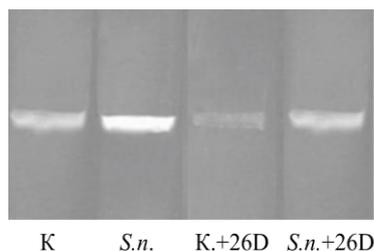


Рисунок 10. Электрофорез амплифицированных фрагментов гена *TaDCL4* у восприимчивого сорта пшеницы Жница через 24 часа после инфицирования *S. nodorum*

Нами показано, что инфицирование патогеном *S. nodorum* в растениях пшеницы сорта Жница вызывало накопление транскриптов гена *TaDCL4* (Шеин и др., 2019). В тоже время, исходя из интенсивности свечения на геле, инокуляция эндофитной бактерией *B. subtilis* 26Д незначительно снижала уровень транскриптов гена *TaDCL4* на 24-часовой точке фиксации. Вероятно, бактериальный штамм, снижая активность гена *TaDCL4*, препятствовала ингибированию экспрессии защитных генов пшеницы и стимулировала таким образом у растений иммунный ответ (Шеин и др., 2020). Поэтому для подтверждения полученных результатов мы изучили активность транскрипции генов семейств *TaAGO* и *TaDCL* у контрастных по устойчивости к септориозу сортов пшеницы Жница и Омская 35 в условиях инокуляции бактериальным штаммом *B. subtilis* 26Д методом ПЦР в реальном времени (рис. 11, 12).

У растений сорта Жница обнаружен выражено высокий уровень транскриптов генов *TaAGO1*, *TaAGO2*, *TaDCL2*, *TaDCL4* через 6 часов после инфицирования *S. nodorum* (рис. 11, 12), по сравнению с неинфицированными образцами. Но, уже к 24 часам опыта, уровень транскриптов этих генов не превышал аналогичные значения контрольных растений, что соответствовало ранее полученным результатам на полиакриламидном геле (рис. 10).

Нами установлено, что инокуляция семян штаммом *B. subtilis* 26Д существенно повышает активность транскрипции генов системы РНКи у растений в условиях инфицирования (рис. 11, 12).

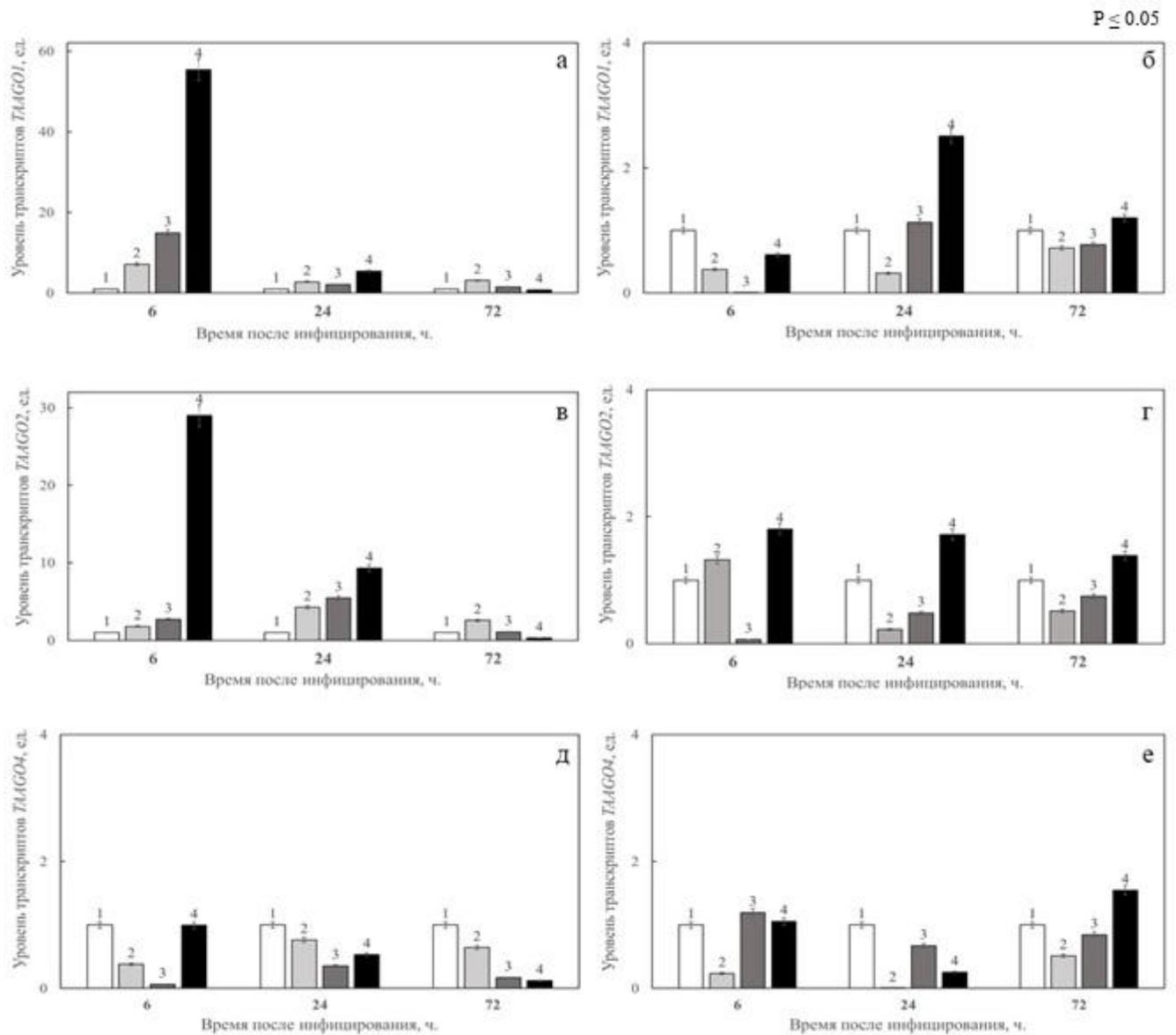


Рисунок 11. Активность транскрипции генов *TaAGO1* (а, б), *TaAGO2* (в, г), *TaAGO4* (д, е) у восприимчивого сорта пшеницы Жница (а, в, д) и устойчивого сорта пшеницы Омская 35 (б, г, е) в условиях инфицирования и при обработке семян бактериальным штаммом *B. subtilis* 26Д: 1- контроль, 2-инфицированные *S.nodorum*, 3- контроль+ *B.subtilis* 26Д, 4- инфицирование+ *B.subtilis* 26Д

Например, как видно из рис. 11 и 12, у восприимчивого сорта пшеницы Жница инокуляция бактериальным штаммом *B. subtilis* 26Д увеличивала активность транскрипции генов системы РНКи. Вместе с тем, в условиях инфицирования уровень транскриптов этих генов возрастал еще более

выраженно, превосходя в некоторых случаях уровень активности транскрипции контрольных неинфицированных образцов в десятки раз: *TaAGO1* - в 55 раз; *TaAGO2* - в 29 раз; *TaDCL2* - 16 раз; *TaDCL4* – в 32 раза.

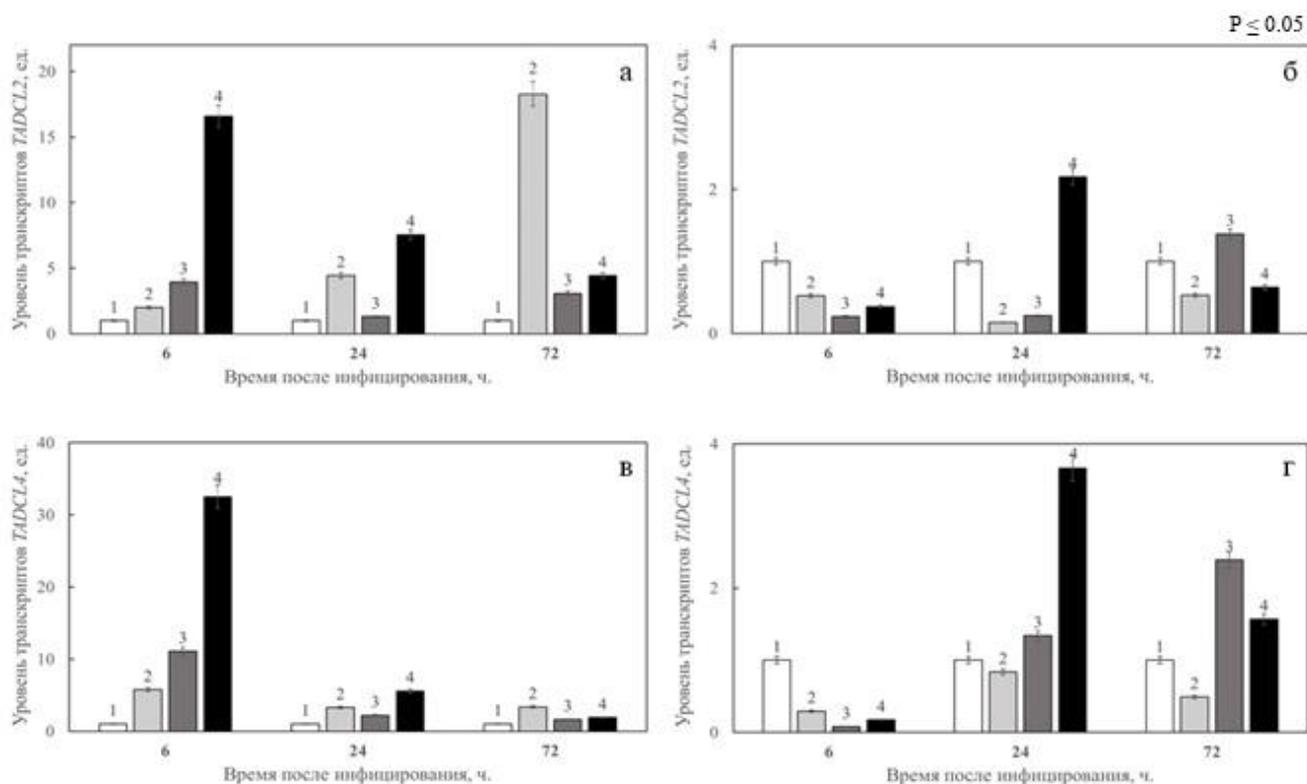


Рисунок 12. Активность транскрипции генов *TaDCL2* (а, б) и *TaDCL4* (в, г) у восприимчивого сорта пшеницы Жница (а, в) и устойчивого сорта Омская 35 (б, г) в условиях инфицирования и при обработке семян бактериальным штаммом *B. subtilis* 26Д: 1-контроль, 2-инфицирование, 3-контроль + *B. subtilis* 26Д, 4-инфицирование + *B. subtilis* 26Д.

Примечательно также, что у сорта пшеницы Омская 35 активность транскрипции исследуемых генов при инокуляции *B. subtilis* 26Д на начальном этапе развития болезни была значительно ниже и они активировались лишь через 24 часа после инфицирования грибом, как и в случае с необработанными образцами: *TaAGO1* - в 2,5 раза; *TaAGO2* - в 1,7 раза; *TaDCL2* - 2 раза; *TaDCL4* – в 3,7 раза (Шеин и др., 2021; Shein et al., 2021). В соответствии с наблюдаемой динамикой развития гриба (рис.3) и с полученными в лаборатории данными об индуцирующей роли *B. subtilis* 26Д (Бурханова и др., 2017, Alekseev et al.,

2021), можно полагать, что гены, вовлеченные в функционирование явления РНКи, действительно непосредственно участвуют в защите пшеницы от гриба и активно экспрессируются, в зависимости от генотипа сорта пшеницы.

3.4 Филогенетический анализ генов *TaAGO* и *TaDCL* мягкой пшеницы

Поскольку геном мягкой пшеницы *T. aestivum* представляет из себя гексааллоплоид, на каждом из 3-х ее гомеологичных геномов имеется собственная копия каждого гена системы РНКи, в рамках проведения данного исследования перед нами также стояла задача определения доли геномной составляющей гена *TaAGO1* в экспрессионной активности у контрастных по устойчивости к септориозу сортов мягкой пшеницы. В базе генетических данных GENBank NCBI на момент анализа была обнаружена информация по ряду мРНК генов *DCL* и *AGO* мягкой пшеницы. Сравнение FASTA последовательностей исследуемых генов мягкой пшеницы с последовательностями аналогичных генов у *DCL* и *AGO* других видов растений (RunBLAST без учета гомологии клонированных фрагментов *T. aestivum*) через базы данных Nucleotide collection (nr/nt) показал, что ген *TaAGO1* (JQ805149.1) гомологичен на 90-94% с локусами ячменя обыкновенного (*Hordeum vulgare*) (AK373112.1, AK250484.1, AK250313.1, AK368293.1), (83-86% - риса посевного (*Oryza sativa Japonica*) (AK111587.1, AK111504.1, AK111553.1), 83-85% - кукурузы (*Zea mays*) (NM_001361411.1, AY109385.1, NM_001350108.1). Среди предсказанных, но не идентифицированных генов, обнаружена 90-98% гомология с нуклеотидной последовательностью локусов в геноме дикой полбы *Triticum dicoccoides* (XM_037602301.1, XM_037567774.1, XM_037630800.1) и 90% в геноме *Aegilops tauschii* (XM_020327154.2, XM_020329698.2, XM_040399561.1). Таким образом, найденный в базе данных NCBI ген *TaAGO1* имеет высокую степень гомологии с аналогичным геном у ряда других злаковых, а также у некоторых растительных объектов (*Oryza sativa Japonica*, *Zea mays*) (табл. 4).

Таблица 4. Степень идентичности гена *TaAGO1* по отношению к аналогичному гену у других организмов

<i>T. aestivum</i> Argonaute (<i>AGO1</i>) - GenBank: JQ805149.1		
Название	Идентичность, %	Номер из GenBank
<i>T. aestivum</i> mRNA, clone: tplb0037b23, cultivar Chinese Spring	99.61	AK447696.1
<i>H. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for predicted protein, complete cds, clone: NIASHv3021H10	94.14	AK373112.1
<i>H. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> cDNA clone: FLbaf83d03, mRNA sequence	90.02	AK250484.1
<i>H. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> cDNA clone: FLbaf72d13, mRNA sequence	89.98	AK250313.1
<i>H. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for predicted protein, partial cds, clone: NIASHv2071I13	90.51	AK368293.1
<i>Oryza sativa</i> Japonica Group cDNA clone: J013091C01, full sequence	85.74	AK111587.1
<i>O. sativa</i> Japonica Group cDNA clone: J013001B21, full sequence	85.67	AK111504.1
<i>O. sativa</i> Japonica Group cDNA clone: J013050D21, full sequence	83.60	AK111553.1
<i>Z. mays argonaute1c</i> (LOC100304327), mRNA	85.01	NM_001361411.1
<i>Z. mays</i> CL857_2 mRNA sequence	83.08	AY109385.1
<i>Z. mays uncharacterized</i> LOC100193970 (LOC100193970), mRNA	83.70	NM_001350108.1
PREDICTED: <i>T. dicoccoides</i> protein argonaute 1B-like (LOC119329285), mRNA	98.27	XM_037602301.1
PREDICTED: <i>T. dicoccoides</i> protein argonaute 1B-like (LOC119288146), mRNA	98.20	XM_037567774.1

Продолжение таблицы 4

PREDICTED: <i>T. dicoccoides</i> protein argonaute 1B (LOC119365190), mRNA	90.31	XM_037630800.1
PREDICTED: <i>A. tauschii</i> subsp. <i>strangulata</i> protein argonaute 1B (LOC109768429), mRNA	99.54	XM_020327154.2
PREDICTED: <i>A. tauschii</i> subsp. <i>strangulata</i> protein argonaute 1B (LOC109770982), transcript variant	90.49	XM_020329698.2
PREDICTED: <i>A. tauschii</i> subsp. <i>strangulata</i> protein argonaute 1B (LOC109770982), transcript variant	90.88	XM_040399561.1

Таблица 5. Степень идентичности гена *TaAGO2* по отношению к аналогичному гену у других организмов

<i>T. aestivum</i> сорт Linmai4 argonaute 2 (<i>ago2</i>) - GenBank: KY794780.1		
Название	Идентичность, %	Номер из GenBank
<i>H. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for predicted protein, complete cds, clone: NIASHv2023F05	95.47	AK364273.1
<i>H. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> cultivar Amagi Nijo marker cMWG694 genomic sequence	95.91	EU282601.1
<i>H. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> cultivar WI2585 marker cMWG694 genomic sequence	95.74	EU282602.1
<i>H. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> cultivar Amagi Nijo marker cMWG694 genomic sequence	95.91	EU282601.1
<i>H. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> cultivar WI2585 marker cMWG694 genomic sequence	95.74	EU282602.1
<i>Z. mays</i> uncharacterized LOC100383767 (LOC100383767), mRNA	77.63	NM_001362141.1

Продолжение таблицы 5

<i>O. sativa</i> Japonica Group cDNA clone: J023007L18, full sequence	79.80	AK120766.1
<i>O. sativa</i> Indica Group cultivar Shuhui498 chromosome 4 sequence	81.41	CP018160.1
<i>O. sativa</i> genomic DNA, chromosome 4, BAC clone: H0525G02, complete sequence	81.41	CT827952.1
<i>O. sativa</i> Japonica Group DNA, chromosome 4, cultivar: Nipponbare, complete sequence	81.36	AP014960.1
<i>O. sativa</i> genomic DNA, chromosome 4, BAC clone: OSJNBa0008M17, complete sequence	81.36	AL662950.2
<i>O. sativa</i> Japonica Group cDNA clone:002-129-F09, full sequence	80.08	AK107521.1
PREDICTED: <i>T. dicoccoides</i> protein argonaute 2-like (LOC119365344), mRNA	99.92	XM_037630962.1
PREDICTED: <i>T. dicoccoides</i> protein argonaute 2-like (LOC119356187), mRNA	98.70	XM_037623115.1
PREDICTED: <i>A. tauschii</i> subsp. strangulata protein argonaute 2 (LOC109771941), mRNA	98.03	XM_020330637.2
PREDICTED: <i>A. tauschii</i> subsp. strangulata protein argonaute 2 (LOC109771943), mRNA	75.48	XM_020330638.2

Таким образом, найденный в базе данных NCBI ген *TaAGO2* имеет высокую степень гомологии с аналогичным геном у ряда других злаковых, а также у некоторых растительных модельных объектов (*Oryza sativa Japonica*, *Zea mays*) (табл. 5). Ген *TaAGO4* (JQ805150.1) проявил 92% гомологию с локусом ячменя обыкновенный (*Hordeum vulgare*) (AK249809.1); 76-80% гомологии с локусами (AK064813.1, AK121307.1, AK122078.1, AK065274.1) у риса посевного (*Oryza sativa Japonica*); 79% гомологии с локусом кукурузы (*Zea mays*) (NM_001359539.1).

Ген *TaAGO2* (KY794780.1) проявил 95-96% гомологию с локусами у ячменя обыкновенного *Hordeum vulgare* (AK364273.1, EU282601.1, EU282602.1, EU282601.1, EU282602.1), 80-81% - риса посевного (*Oryza sativa Japonica*) (AK120766.1, CP018160.1, CT827952.1, AP014960.1, AL662950.2, AK107521.1), 78% - кукурузы (*Zea mays*) (NM_001362141.1).

Таблица 6. Степень идентичности гена *TaAGO4* по отношению к аналогичному гену у других организмов

<i>T. aestivum</i> Argonaute (<i>AGO4</i>) - GenBank: JQ805150.1		
Название	Идентичность, %	Номер из GenBank
<i>H. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> cDNA clone: FLbaf58d21, mRNA sequence	92.40	AK249809.1
<i>O. sativa</i> Japonica Group cDNA clone: J013000E08, full insert sequence	80.52	AK064813.1
<i>O. sativa</i> Japonica Group cDNA clone: J023111L20, full insert sequence	80.49	AK121307.1
<i>O. sativa</i> Japonica Group cDNA clone: J033119H08, full insert sequence	76.45	AK122078.1
<i>O. sativa</i> Japonica Group cDNA clone: J013002L10, full insert sequence	76.65	AK065274.1
<i>Z. mays</i> uncharacterized LOC100217027 (LOC100217027), mRNA	78.92	NM_001359539.1
PREDICTED: <i>T. dicoccoides</i> protein argonaute 4A-like (LOC119267988), transcript variant X3, mRNA	98.81	XM_037549464.1
PREDICTED: <i>T. dicoccoides</i> protein argonaute 4A-like (LOC119267988), transcript variant X2, mRNA	99.00	XM_037549463.1

Продолжение таблицы 6

PREDICTED: <i>T. dicoccoides</i> protein argonaute 4A (LOC119275850), transcript variant X1, mRNA	97.17	XM_037556776.1
PREDICTED: <i>A. tauschii</i> subsp. <i>strangulata</i> protein argonaute 4A (LOC109776966), transcript variant X1, mRNA	99.09	XM_020335624.2
PREDICTED: <i>A. tauschii</i> subsp. <i>strangulata</i> protein argonaute 4A (LOC109776966), transcript variant X2, mRNA	98.99	XM_020335623.2

Среди предсказанных, но не идентифицированных генов, обнаружена 97-99% гомология с нуклеотидной последовательностью из генома дикой полбы (*Triticum dicoccoides*) (XM_037549464.1, XM_037549463.1, XM_037556776.1) и 98-99% эгилопса тауша (*Aegilops tauschii*) (XM_020335624.2, XM_020335623.2). Таким образом, найденный в базе данных NCBI ген *TaAGO4* имеет высокую степень гомологии с аналогичным геном у ряда других злаковых, а также у некоторых растительных модельных объектов (*Oryza sativa Japonica*, *Zea mays*) (табл. 6).

Таблица 7. Степень идентичности гена *TaDCL2* по отношению к аналогичному гену у других организмов

<i>T. aestivum</i> сорт Linmai4 dicer-like protein (<i>dcl2</i>) mRNA, complete cds – GenBank: KY794782.1		
Название	Идентичность, %	Номер из GenBank
<i>Z. mays</i> dicer-like 105 (LOC100192986), mRNA	75.66	NM_001348153.1
<i>O. sativa</i> Japonica Group cDNA clone: J023044C15, full insert sequence	78.87	AK072334.1

<i>O. sativa</i> Indica Group cultivar Shuhui498 chromosome 3 sequence	83.87	CP018159.1
<i>O. sativa</i> Indica Group cultivar Shuhui498 chromosome 9 sequence	83.64	CP018165.1
<i>O. sativa</i> Japonica Group DNA, chromosome 9, cultivar: Nipponbare, complete sequence	83.64	AP014965.1
<i>O. sativa</i> Japonica Group DNA, chromosome 3, cultivar: Nipponbare, complete sequence	83.64	AP014959.1
<i>O. sativa</i> Japonica Group genomic DNA, chromosome 9, BAC clone: OSJNBa0057D11	83.64	AP005802.3
<i>O. sativa</i> Japonica Group genomic DNA, chromosome 9, BAC clone: OSJNBb0079G12	83.64	AP005782.3
<i>O. sativa</i> Indica Group cultivar RP Bio-226 chromosome 3 sequence	83.45	CP012611.1
<i>Digitaria exilis</i> annotation	82.53	LR792836.1
<i>D. exilis</i> genome assembly, chromosome: 9A	82.53	LR761621.1
<i>D. exilis</i> genome assembly, chromosome: 9B	82.03	LR761622.1
<i>Setaria viridis</i> cultivar ME034v chromosome 9	84.48	CP050803.1
PREDICTED: <i>T. dicoccoides</i> endoribonuclease Dicer homolog 2a-like (LOC119299586)	98.62	XM_037576772.1
PREDICTED: <i>A. tauschii</i> subsp. <i>strangulata</i> endoribonuclease Dicer homolog 2a (LOC109750274)	99.93	XM_020309231.2

Ген *TaDCL2* (KY794782.1) проявил 78-83% гомологию с локусами у риса посевного (*Oryza sativa* Japonica) (AK072334.1, CP018159.1, CP018165.1, AP014965.1, AP014959.1, AP005802.3, AP005782.3, CP012611.1), 75% - гомологию кукурузы (*Zea mays*) (NM_001348153.1), 82% - росички тонкой (*Digitaria exilis*) (LR792836.1, LR761621.1, LR761622.1) и 84% зеленого

щитинника (*Setaria viridis*) (CP050803.1). Среди предсказанных белков была обнаружена 98% гомология с дикой полбой (*Triticum dicoccoides*) (XM_037576772.1) и 99% гомология с эгилопсом тауша (*Aegilops tauschii*) (XM_020309231.2). Таким образом, найденный в базе данных NCBI ген *TaDCL2* имеет высокую степень гомологии с аналогичным геном у ряда других злаковых, а также у некоторых растительных модельных объектов (*Oryza sativa Japonica*, *Zea mays*) (табл. 7).

Таблица 8. Степень идентичности гена *TaDCL4* по отношению к аналогичному гену у других организмов

<i>T. aestivum</i> сорт Linmai4 dicer-like protein (<i>dcl4</i>) mRNA, partial cds – GenBank: KY794783.1		
Название	Идентичность, %	Номер из GenBank
<i>O. sativa</i> Japonica Group dicer-like protein (DCL4) mRNA, complete cds	81.89	EU009924.1
<i>O. sativa</i> Japonica Group cDNA clone: J013072H23, full insert sequence	81.80	AK066586.1
<i>O. sativa</i> Indica Group cultivar Shuhui498 chromosome 4 sequence	86.14	CP018160.1
<i>O. sativa</i> Japonica Group DNA, chromosome 4, cultivar: Nipponbare, complete sequence	86.14	AP014960.1
<i>O. sativa</i> Indica Group cultivar RP Bio-226 chromosome 4 sequence	86.14	CP012612.1
<i>O. sativa</i> genomic DNA, chromosome 4, BAC clone: OSJNBb0065L13, complete sequence	86.14	AL606607.3
<i>Z. mays</i> cultivar B73 dicer-like protein 4 (<i>dcl4</i>)	80.41	KR230386.1
<i>Ipomoea trifida</i> cultivar NCNSP0306 chromosome 7	78.03	CP025650.1

PREDICTED: <i>T. dicoccoides</i> endoribonuclease Dicer homolog 4-like (LOC119364870), transcript variant X1, mRNA	98.40	XM_037630431.1
PREDICTED: <i>T. dicoccoides</i> endoribonuclease Dicer homolog 4-like (LOC119355710), transcript variant X3, mRNA	98.35	XM_037622564.1
PREDICTED: <i>T. dicoccoides</i> endoribonuclease Dicer homolog 4-like (LOC119364870), transcript variant X2, mRNA	98.35	XM_037630432.1
PREDICTED: <i>T. dicoccoides</i> endoribonuclease Dicer homolog 4-like (LOC119355710), transcript variant X4, mRNA	98.28	XM_037622565.1
PREDICTED: <i>T. dicoccoides</i> endoribonuclease Dicer homolog 4-like (LOC119355710), transcript variant X5, mRNA	98.42	XM_037622566.1
PREDICTED: <i>A. tauschii</i> subsp. <i>strangulata</i> endoribonuclease Dicer homolog 4 (LOC109749372) transcript variant X3, mRNA	99.95	XM_020308334.2
PREDICTED: <i>A. tauschii</i> subsp. <i>strangulata</i> endoribonuclease Dicer homolog 4 (LOC109749372) transcript variant X1, mRNA	99.95	XM_020308331.2
PREDICTED: <i>A. tauschii</i> subsp. <i>strangulata</i> endoribonuclease Dicer homolog 4 (LOC109749372) transcript variant X2, mRNA	99.88	XM_020308332.2

Ген *TaDCL4* (KY794783.1): 81-86% гомологии с локусами посевным рисом (*Oryza sativa Japonica*) (EU009924.1, AK066586.1, CP018160.1, AP014960.1, CP012612.1, AL606607.3); 80% гомологии с растением кукурузы (*Zea mays*) (KR230386.1), 78% гомологии с ипомеей (*Ipomoea trifida*)

(CP025650.1). Среди предсказанных белков была обнаружена 98% гомология с дикой полбой (*Triticum dicoccoides*) (XM_037630431.1, XM_037622564.1, XM_037630432.1, XM_037622565.1, XM_037622566.1) и 99% гомология с эгилопсом тауша (*A. tauschii*) (XM_020308334.2, XM_020308331.2, XM_020308332.2). Таким образом, найденный в базе данных NCBI ген *TaDCLA* имеет высокую степень гомологии с аналогичным геном у ряда других злаковых, а также у некоторых других видов (табл. 8).

Далее, нами был проведен анализ секвенированных фрагментов гена *TaAGO1* у двух контрастных по устойчивости к септориозу сортов мягкой пшеницы: Жница (восприимчивый) и Омская 35 (устойчивый). Праймеры для выделения фрагмента гена *TaAGO1* и последующего секвенирования были подобраны таким образом, чтобы они охватывали всю кодирующую область последовательности гена *TaAGO1* и при этом перекрывались между собой. В результате были подобраны 5 пар праймеров, которые получили условные названия A1-A5, в соответствии с их расположением на кодирующей последовательности гена *TaAGO1* (рис 13).

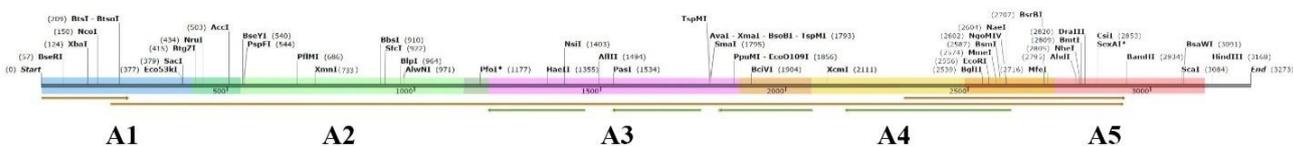


Рисунок 13. Схема расположения подобранных к фрагментам гена *TaAGO1* праймеров в программе SnapGene Viewer

Полученные в процессе амплификации фрагменты к ДНК проверяли на наличие неспецифических участков другого размера на акриламидном геле методом электрофореза. Затем, полученные фрагменты вырезали из геля для дополнительной очистки и последующего секвенирования (рис. 14). Тем не менее, по результатам секвенирования на ампликонах, соответствующих праймерам A1-A4, наблюдалось большое количество неспецифических фрагментов, а иногда и не наблюдался целевой продукт.

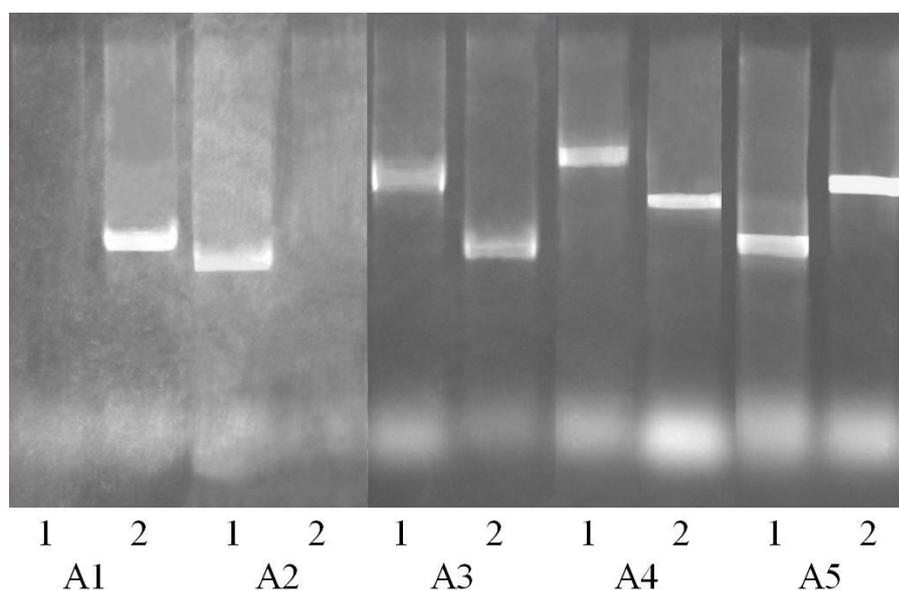


Рисунок 14. Электрофорез амплифицированных фрагментов ДНК гена *TaAGO1* у сортов Жница (1) и Омская 35 (2) на полиакриламидном геле с использованием различных праймеров (табл. 3, рис. 13)

С другой стороны, амплифицированный фрагмент A5 гена *TaAGO1* был просеквенирован и неспецифические фрагменты в нем идентифицированы не были. Мы предполагаем, что, несмотря сложную организацию генома мягкой пшеницы *T. aestivum* L. ввиду его гексаплоидности (Щербань и др., 2012; Wang et al., 2013), нам удалось успешно просеквенировать фрагмент A5, так как соответствующие праймеры (в частности Forward) располагались на месте домена PIWI. Известно, что данный домен, в отличие, например, от домена PAZ, имеет относительно консервативное строение у различных видов растений и не сильно различается между тремя копиями гена *TaAGO1* у мягкой пшеницы (Meng et. al, 2013). И если в случае с фрагментами A1-A4 анализ нуклеотидной последовательности не представлялся возможным в виду образования на этапе секвенирования пиков, соответствующих различным нуклеотидам для каждой копии исследуемого гена, то у фрагмента A5 различия между копиями гена были не столь выраженными и зафиксированные на этапе секвенирования пики соответствовали копии с наибольшей концентрацией. Следовательно, подобранные к этому участку

праймеры позволили нам идентифицировать реализуемую копию данного участка *TaAGO1* у контрастных по устойчивости к возбудителю септориоза сортов мягкой пшеницы Жница и Омская 35 и сравнить ее с исходной ДНК сорта мягкой пшеницы Chinese Spring и последовательностями предковых форм из международной генетической базы данных.

Полученные нами данные о нуклеотидной последовательности генов *TaAGO1* исследуемых сортов мягкой пшеницы выравнивали и анализировали по сравнению с референсными последовательностями гена *TaAGO1* на хромосомах 7A и 7D мягкой пшеницы (<https://www.uniprot.org/taxonomy/4565>) и предполагаемых предковых формах *Aegilops tauchi* (7D) и *Triticum urartu* (7A) из базы данных «Ensembl Plants» (<https://plants.ensembl.org>), а также с полногеномной и мРНК последовательностями у модельного сорта мягкой пшеницы «Chinese Spring» из баз данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) в программе «BioEdit» (рис. 15). Поиск исследуемого участка A5 копии гена *TaAGO1* на хромосоме 7B мягкой пшеницы не выявил наличия данного исследуемого фрагмента необходимого размера, поэтому в данной работе он не рассматривался. В ходе анализа мы ориентировались в первую очередь на выравненную последовательность мРНК и не рассматривали изменения в некодирующих областях полногеномной последовательности *TaAGO1*.

В программе BioEdit методом ClustalW были обнаружены следующие отличия нуклеотидной последовательности кДНК исследуемых сортов пшеницы Жница и Омская 35, полученных после секвенирования, от последовательности типового сорта Chinese spring: 6923-6927 – делеция у обоих сортов, 7041-7137 – делеция у обоих сортов, 6858 – замена основания Тимин на Аденин у сорта Жница; 6860 – замена основания Аденин на Тимин у сорта Омская 35 и делеция у сорта Жница, 7654 – замена основания Цитозин на Тимин у сорта Жница; 7896- инсерция основания Цитозин у сорта Жница, 7915 – замена основания Гуанин на Цитозин у обоих сортов; 7920 – замена основания Гуанин на Тимин у сорта Омская 35; 7923 – инсерция основания

Гуанина у обоих сортов, 7930 – инсерция основания Аденина у сорта Омская 35, 7940 – замена основания Гуанин на Тимин у обоих сортов.

После выравнивания и анализа, нуклеотидные последовательности были трансформированы в последовательности кодируемых ими аминокислот (рис. 16).

Среди выявленных отличий особый интерес представляли замена аминокислоты Пролин на Серин у сорта Жница в положении 2552 (рис. 15), замена аминокислоты Лейцин на Фенилаланин (соответствует амк с хромосомы 7А) у сорта Омская 35 в положении 2640, а также замена аминокислоты Глицин на Аланин у обоих сортов в положении 2639. Помимо этого, были также выявлен ряд менее информативных аминокислотных замен: 2632 – замена случайной (X) аминокислоты на Пролин у сорта Жница; 2641 – замена случайной (X) аминокислоты на Глицин у обоих сортов; 2644 – замена случайной (X) аминокислоты на Аспарагиновую кислоту у сорта Омская 35, 2647 – замена случайной (X) аминокислоты на Валин у сорта Жница.

Следует также отметить, что полученные после секвенирования ДНК нуклеотидные последовательности у исследуемых сортов пшеницы оказались более гомологичными к последовательности этого же гена у эгилопса *Ae. tauschii* (7D), по сравнению с гомеологической последовательностью гена *TaAGO1* у мягкой пшеницы (7D), имеющейся в базе данных «Ensembl Plants».

Затем, учитывая возможное наличие ошибок и последующее их накопление при работе с алгоритмом ClustalW, мы провели аналогичный анализ в программе MEGA11 методом MUSCLE (Рис. 17).

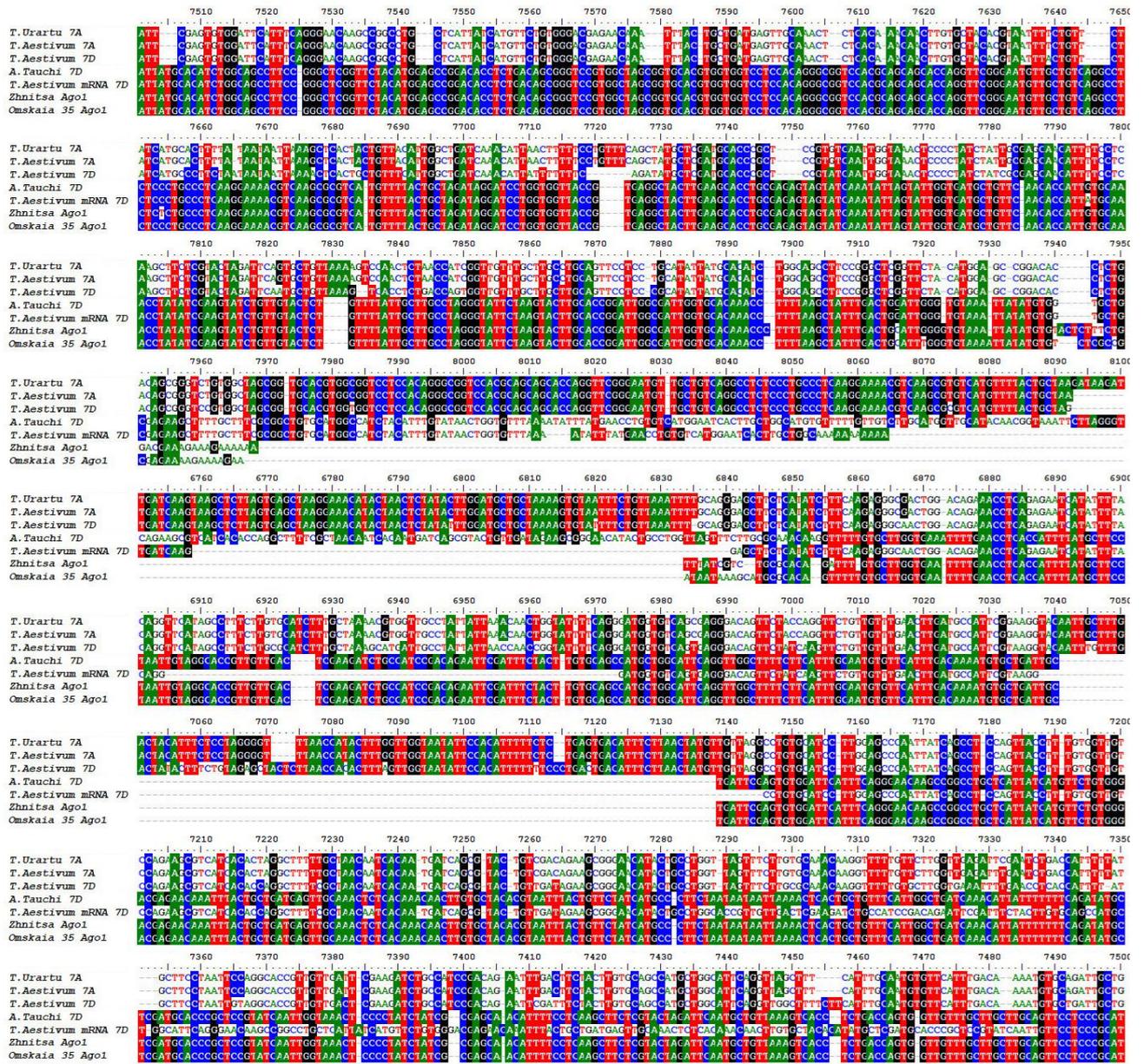


Рисунок 15. Выравнивание нуклеотидных последовательностей в программе BioEdit

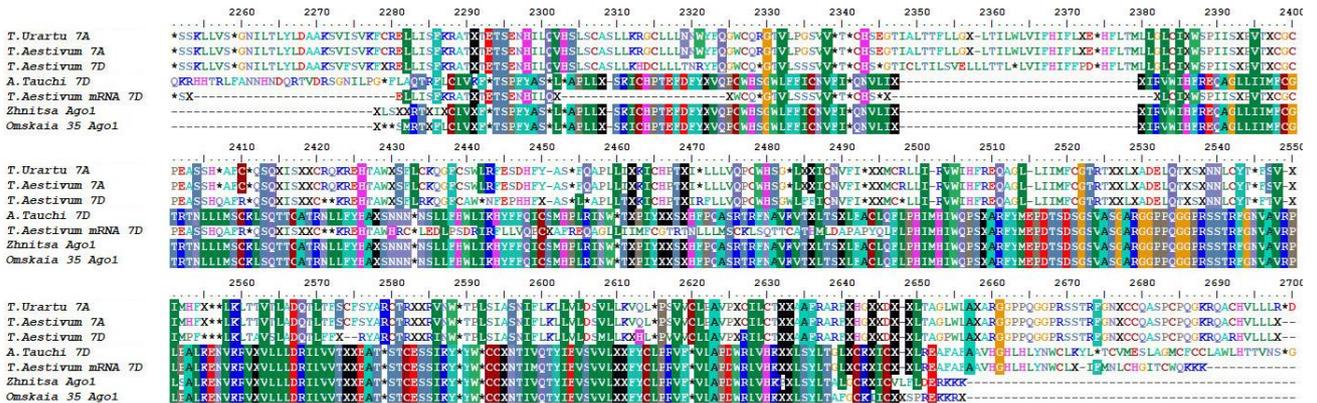


Рисунок 16. Выравнивание аминокислотных последовательностей в программе BioEdit

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbr	
1. T. Liano 7A	G G C C C C A G G G C G G C C A C G C A G C A C C A G G T T C G G G A A T G T T G C T G T C A G G C C T C T C C T G C C C T C A A G G A A A A C G T C A A G C G G T C A G T T T T A C T G C
2. T. Aestrum 7A	G G T C C C C C A G G G C G G T C C A C G C A G C A C C A G G T T C G G G A A T G T T G C T G T C A G G C C C T C T C C T G C C C T C A A G G A A A A C G T C A A G C G G T C A G T T T T A C T G C
3. A. Tauchi 7D	G G T C C C C C A G G G C G G T C C A C G C A G C A C C A G G T T C G G G A A T G T T G C T G T C A G G C C C T C T C C T G C C C T C A A G G A A A A C G T C A A G C G G T C A G T T T T A C T G C
4. T. Aestrum 7D	G G T C C C C C A G G G C G G T C C A C G C A G C A C C A G G T T C G G G A A T G T T G C T G T C A G G C C C T C T C C T G C C C T C A A G G A A A A C G T C A A G C G G T C A G T T T T A C T G C
5. T. Aestrum Ago1 (Chinese Spring) 7D whole genome	G G T C C C C C A G G G C G G T C C A C G C A G C A C C A G G T T C G G G A A T G T T G C T G T C A G G C C C T C T C C T G C C C T C A A G G A A A A C G T C A A G C G G T C A G T T T T A C T G C
6. T. Aestrum Ago1 (Chinese Spring) 7D mRNA	G G T C C C C C A G G G C G G T C C A C G C A G C A C C A G G T T C G G G A A T G T T G C T G T C A G G C C C T C T C C T G C C C T C A A G G A A A A C G T C A A G C G G T C A G T T T T A C T G C
7. T. Aestrum Ago1 (Zhntsa)	G G T C C C C C A G G G C G G T C C A C G C A G C A C C A G G T T C G G G A A T G T T G C T G T C A G G C C C T C T C C T G C C C T C A A G G A A A A C G T C A A G C G G T C A G T T T T A C T G C
8. T. Aestrum Ago1 (Omskaia 35)	G G T C C C C C A G G G C G G T C C A C G C A G C A C C A G G T T C G G G A A T G T T G C T G T C A G G C C C T C T C C T G C C C T C A A G G A A A A C G T C A A G C G G T C A G T T T T A C T G C

Рисунок 17. Выравнивание нуклеотидных последовательностей в программе MEGA11

В результате более точного выравнивания с помощью данного алгоритма мы получили гораздо более единообразную картину. Тем не менее, на рисунке видно, что рассматриваемый участок нуклеотидной последовательности гена *TaAGO1* различается на хромосомах 7A и 7D. Вместе с тем видно (рис. 17, рис. 18), что сорта пшеницы Жница и Омская 35 имели нуклеотидную и аминокислотную последовательности, идентичные последовательностям на хромосоме 7D, что может свидетельствовать о геномной важности этой копии гена *TaAGO1* в реализации защитного ответа растения пшеницы на инфицирование патогенным грибом *S. nodorum*.

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbr	
1. T. Liano 7A	M * T P L S I A S N I F L K L L V L D S V L L K V Q L * P V V C L L A V P P A Y Y A H L A A F R A R F Y M E P D T S D S G S V A S G A R G P P Q G P R S S T R F G N V A V R R L P A L K E N V K R V M F Y C
2. T. Aestrum 7A	M * T P L S I A S N I F L K L L V L D S V L L K V Q L * P V V C L L A V P P A Y Y A H L A A F R A R F Y M E P D T S D S G S V A S G A R G P P Q G P R S S T R F G N V A V R R L P A L K E N V K R V M F Y C
3. A. Tauchi 7D	M * T P L S I A S N I F L K L L V L D S M L L K 7 H L * P V V C L L A V P P A Y Y A H L A A F R A R F Y M E P D T S D S G S V A S G A R G P P Q G P R S S T R F G N V A V R R L P A L K E N V K R V M F Y C
4. T. Aestrum 7D	M * T P L S I A S N I F L K L L V L D S M L L K 7 H L * P V V C L L A V P P A Y Y A H L A A F R A R F Y M E P D T S D S G S V A S G A R G P P Q G P R S S T R F G N V A V R R L P A L K E N V K R V M F Y C
5. T. Aestrum Ago1 (Chinese Spring) 7D whole genome	M * T P L S I A S N I F L K L L V L D S M L L K 7 H L * P V V C L L A V P P A Y Y A H L A A F R A R F Y M E P D T S D S G S V A S G A R G P P Q G P R S S T R F G N V A V R R L P A L K E N V K R V M F Y C
6. T. Aestrum Ago1 (Chinese Spring) 7D mRNA	M * T P L S I A S N I F L K L L V L D S M L L K 7 H L * P V V C L L A V P P A Y Y A H L A A F R A R F Y M E P D T S D S G S V A S G A R G P P Q G P R S S T R F G N V A V R R L P A L K E N V K R V M F Y C
7. T. Aestrum Ago1 (Zhntsa)	M * T P L S I A S N I F L K L L V L D S M L L K 7 H L * P V V C L L A V P P A Y Y A H L A A F R A R F Y M E P D T S D S G S V A S G A R G P P Q G P R S S T R F G N V A V R R L P A L K E N V K R V M F Y C
8. T. Aestrum Ago1 (Omskaia 35)	M * T P L S I A S N I F L K L L V L D S M L L K 7 H L * P V V C L L A V P P A Y Y A H L A A F R A R F Y M E P D T S D S G S V A S G A R G P P Q G P R S S T R F G N V A V R R L P A L K E N V K R V M F Y C

Рисунок 18. Выравнивание предположительных аминокислотных последовательностей TaAGO1 в программе MEGA11

Кроме того, выравнивание нуклеотидной последовательности в программе MEGA11 также выявило у сорта Жница однонуклеотидную замену (рис. 17), ведущую к замене аминокислоты Пролин на Серин в положении 855 (рис. 18), подтвердив тем самым данные анализа в программе BioEdit.

При помощи онлайн-ресурсов InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>) и NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), на основе аминокислотной последовательности белка TaAGO1 была проанализирована его структура и определены положения функциональных доменов. Выяснилось, что замена аминокислоты в положении 855 не входит в состав

Сходная картина наблюдалась и на филогенетическом древе генов семейства *DCL* (Рис. 21). Одни и те же гены *DCL* у разных растительных видов располагались ближе друг к другу на филогенетическом древе, чем к другим генам внутри одного и того же вида. При этом гены *DCL4* располагаются в отдельной от *DCL2*, *DCL3* и *DCL1* группе, что соответствует литературным данным (Krishnatreya et al. 2021). Вместе с тем, анализ исследуемых генов *DCL2* и *DCL4* у разных видов злаковых выявил одинаковое (зеркальное) их расположение по отношению друг к другу, согласно которому гены мягкой пшеницы, фрагменты кДНК которых были нами просеквенированы, находятся ближе на филогенетическом древе к аналогичным генам эгилопса *Ae. tauschii*, по сравнению с соответствующими генами других злаков.

Далее, на основе имеющихся предположительных аминокислотных последовательностей, при помощи онлайн-ресурса «SWISS-MODEL» (<https://swissmodel.expasy.org>), были построены объемные модели белка TaAGO1, соответствующих просеквенированным фрагментам кДНК (рис. 22). На рисунке видно, что аминокислотная замена в структуре белка ведет к изменению его пространственной организации.

Наконец, при помощи ресурса «Prot pi» (<https://www.protpi.ch/Calculator/ProteinTool>) был проведен сравнительный анализ белка TaAGO1 и его варианта с заменой аминокислоты у сорта Жница по ряду физико-химических показателей (табл. 9). Так, согласно проведенному анализу предположительной аминокислотной последовательности белка TaAGO1, данная замена аминокислоты с Пролина на Серин, с учетом различий молекулярной массы и гидропатического индекса (полярности) между аминокислотами, вела к снижению его молекулярной массы (Molecular Mass) и абсорбционного коэффициента (Absorption Coefficient). Таким образом, обнаруженные нами изменения в последовательности кДНК гена *TaAGO1* у восприимчивого к септориозу сорта пшеницы Жница, способствовали изменению и третичной структуры белка, что в последствии могло сказаться на его функционировании.

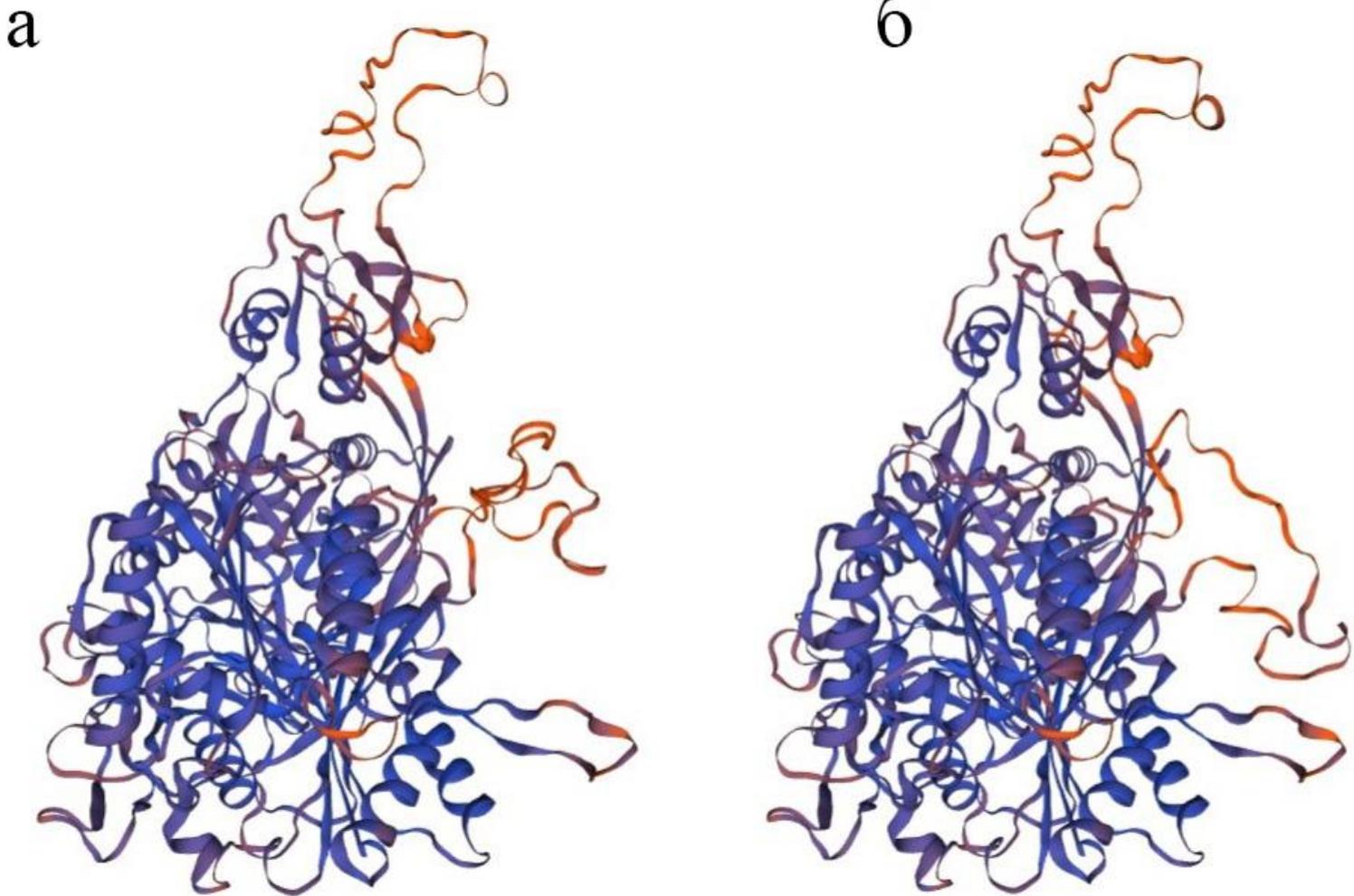


Рисунок 22. Предположительные объемные модели четвертичной структуры белка TaAGO1 (а) и его варианта с заменой аминокислоты Пролин на Серин (б)

Таблица 9. Сравнительная характеристика белка TaAGO1 и его варианта с заменой аминокислоты Пролин на Серин

	Оригинальный белок	Белок с заменой пролина на серин
Молекулярная формула	$C_{4338}H_{6869}N_{1261}O_{1250}S_{34}$	$C_{4336}H_{6867}N_{1261}O_{1251}S_{34}$
Изоэлектрическая точка (pI)	8.978	
Заряд при pH 7.4 (z)	+23.246	
Средняя масса (m_{av})	97'778.029 Da	97'767.9911 Da
Теоретическое отношение pI/m_{av} (https://web.expasy.org/compute_pi/)	9.29 / 97779.00	9.29 / 97768.96
Моноизотопная масса (m_{mono})	97'717.3202 Da	97'707.2994 Da
Молярная масса (по абсорбционному коэффициенту)	$\epsilon_{\lambda=280nm} = 80'680 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	
	$\epsilon_{\lambda=214nm} = 1'656'724 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\epsilon_{\lambda=214nm} = 1'654'083 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Масса (по абсорбционному коэффициенту)	$\epsilon'_{\lambda=280nm} = 0.825 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	
	$\epsilon'_{\lambda=214nm} = 16.94 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\epsilon'_{\lambda=214nm} = 16.92 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

В совокупности с данными об активности транскрипции гена *TaAGO1* у сорта пшеницы Жница (рис. 4), степени поражения данного сорта патогеном (рис. 2), а также роли домена PIWI и гомологии участка с заменой с рибонуклеазами H (рис. 19) можно полагать, что данная аминокислотная замена могла оказывать влияние на степень активности белка TaAGO1 при инфицировании возбудителем септориоза.

3.5 Активность транскрипции генов системы РНКи у патогенного гриба *S. nodorum* в условиях выращивания на питательной среде

В рамках данного исследования нас также интересовала активность транскрипции генов *AGO* и *DCL* участвующих в явлении РНКи патогенного гриба *S. nodorum* в условиях непосредственного воздействия на гриб СК и ЖК (*in vitro*).

На первом этапе работ, прежде чем проводить оценку активности генов *AGO* и *DCL* фитопатогенных грибов при инфицировании, необходимо было выяснить, как эти гены функционируют вне патосистемы, когда гриб растет

сапротрофно на питательных средах. Так, с использованием выращенного в жидкой культуре мицелия гриба *S. nodorum* штамма SnB, был оценен экспрессионный статус исследуемых генов *AGO* и *DCL* при добавлении в питательную среду СК с конечными концентрациями 10^{-6} , 10^{-5} и 10^{-4} М, а также ЖК с конечными концентрациями 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} М на 5е, 7е и 14-е сутки после посадки на среды (рис. 23).

Установлено, что при выращивании гриба на питательной среде, активность гена *SnAGO1* у образцов мицелия гриба в отсутствие СК и ЖК возрастала на 7-е сутки после начала культивирования. Активность гена *SnAGO2* в контрольных колониях гриба возрастала в течение эксперимента, но менее выражено. При добавлении в питательную среду СК наблюдалось выраженное повышение уровня транскриптов всех исследуемых генов *SnAGO* уже на 5-е сутки, причем степень накопления транскриптов этих генов была прямо-пропорциональна концентрации СК. Аналогичные данные были получены и при добавлении в среду ЖК. При этом обращает на себя внимание то, что добавление сигнальных молекул во всех вариантах эксперимента, в особенности все концентрации ЖК и относительно высокие концентрации СК, сдвигают накопление транскриптов генов на более ранний срок (рис. 23).

Особо следует обратить при этом внимание на то, что наиболее чувствительной к добавлению в среду культивирования ЖК оказались гены *SnAGO1* и *SnAGO18*. Во всех вариантах с СК и ЖК в среде культивирования образование спорносящих органов пикнид наблюдалось в более ранние сроки. Поскольку мы наблюдали параллельное накопление в среде культивирования органов спороношения гриба - пикнид, можно полагать, что и СК, и ЖК стимулируют в клетках гриба метаболические процессы, подобно тому, как в экспериментах с γ -аминомасляной кислотой, обладающей высокой сигнальной активностью (Mead et al., 2013). Визуально заметного ингибирования роста грибов в вариантах эксперимента с использованными концентрациями СК и ЖК не наблюдалось.

На рис. 24 представлены данные по оценке активности транскрипции гена *SnDCL1*, выделенных из мицелия гриба *S. nodorum*, где видно, что по мере культивирования уровень транскриптов снижается как в контрольных, так и в экспериментальных условиях, в сравнении с начальной точкой фиксации. При этом обращает на себя внимание прямая концентрационная зависимость накопления транскриптов гена *SnDCL1* в мицелии в варианте культивирования гриба на средах, содержащих СК. Чем выше концентрация СК в среде культивирования, тем больший уровень транскриптов гена мы наблюдаем в первой точке фиксации (рис. 24). Кроме того, СК с концентрацией 10^{-6} М способствуют подавлению накопления транскриптов этого гена. Добавление в среду культивирования ЖК также стимулировало накопление транскриптов гена *SnDCL1*.

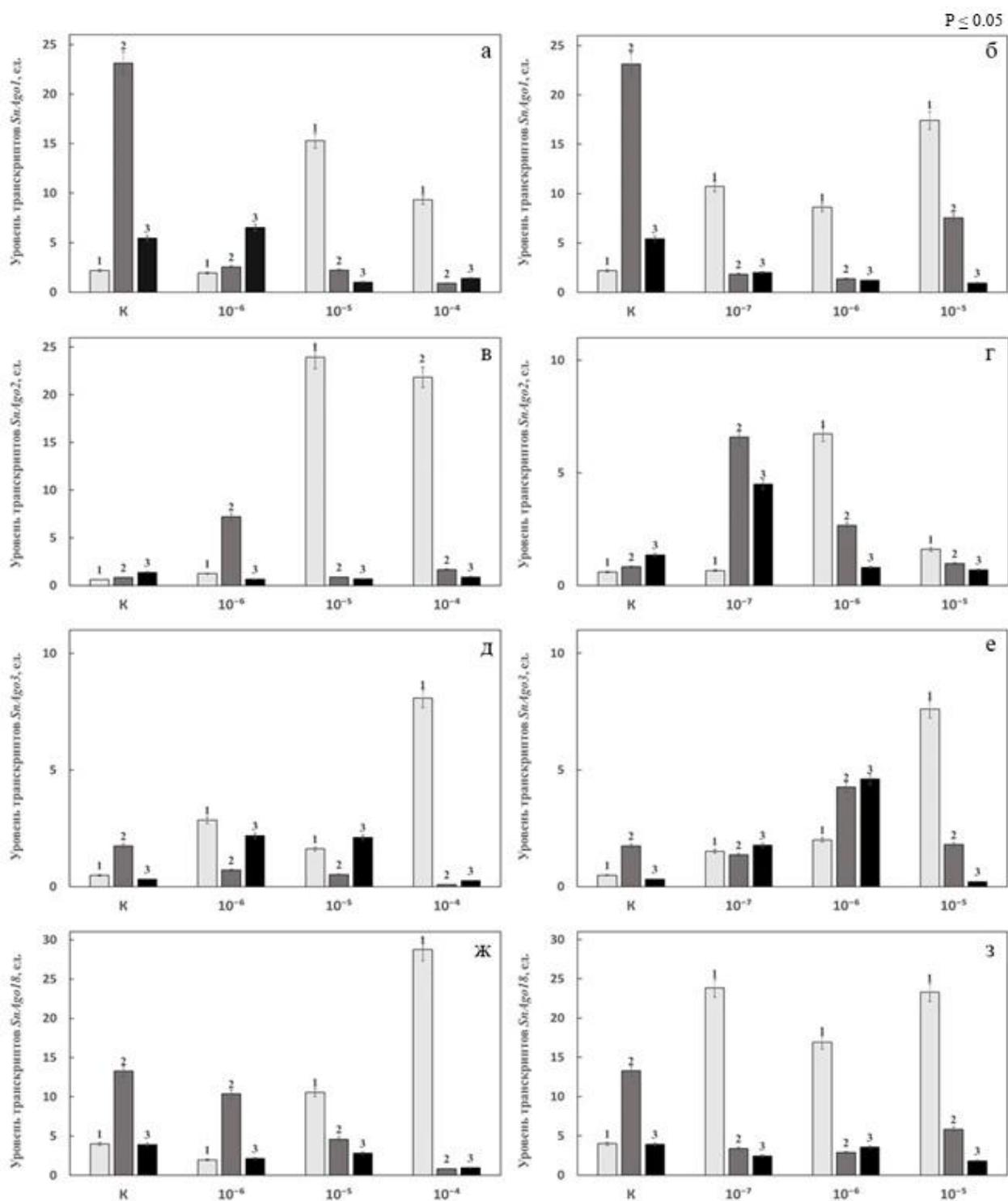


Рисунок 23. Изменения уровня транскриптов генов *SNAGO* гриба *S. podorum* выращенного на жидкой питательной среде с добавлением салициловой (а, в, д, ж) и жасмоновой (б, г, е, з) кислот различной концентрации (М) через 5 (1), 7 (2) и 14 (3) суток после посадки а, б – *SNAGO1* (Snog_12157); в, г – *SNAGO2* (Snog_10544); д, е – *SNAGO3* (Snog_10546); ж, з – *SNAGO18* (Snog_12309)

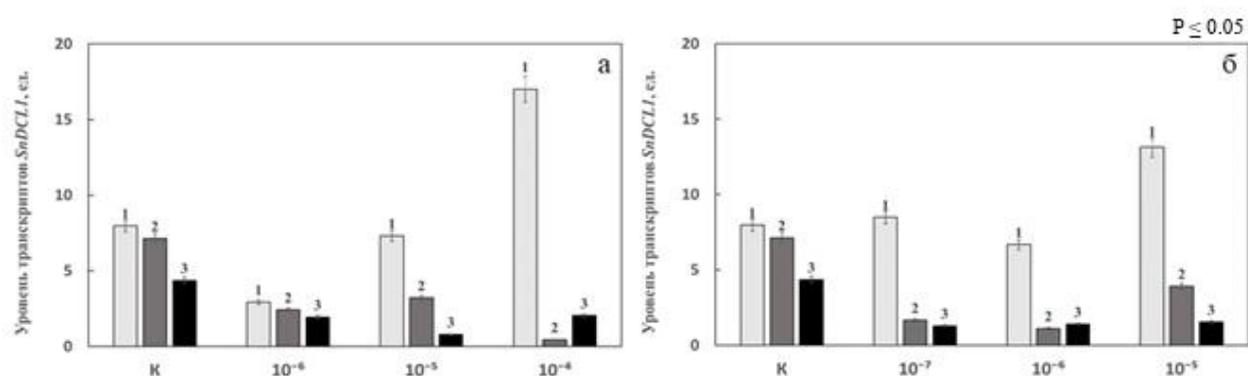


Рисунок 24. Изменения в уровне транскриптов гена *SnDCL1* (*Snog_08521*) гриба *S. nodorum* выращенного на жидкой питательной среде с добавлением салициловой (а) и жасмоновой (б) кислот различной концентрации (М) через 5 (1), 7 (2) и 14 (3) суток после посадки

3.6 Активность транскрипции генов системы РНКи у патогенного гриба *S. nodorum* в условиях инфицирования растений пшеницы в норме и после предварительной предпосевной обработки семян салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислотами

Ранее нам не было известно, как ведут себя гены патогена *SnAGO*, ответственные за формирование РНКи, в условиях инфицирования восприимчивых и устойчивых сортов растений пшеницы. Для этого мы провели анализ активности транскрипции ряда генов гриба *S. nodorum* в растениях контрастных по устойчивости к патогену сортов мягкой пшеницы, инфицированных патогеном, в условиях их предобработки СК и ЖК, а также их композитом (рис. 25; рис. 26). Как видно из данного рисунка, при инфицировании листьев пшеницы спорами гриба в течение наблюдаемого периода происходит накопление транскриптов генов *SNAGO1*, *SNAGO2* и *SNAGO3*. Причем обращает на себя внимание то, что на устойчивом сорте Омская 35 уровень транскриптов изученных генов становится намного выше в течении изученного периода. Учитывая различия в площади поражения листа септориозом между сортами пшеницы (рис. 2) и резкое накопление транскриптов генов, ответственных за хозяйскую РНКи, у устойчивого сорта пшеницы Омская 35 (рис. 4) на 24-часовой точке фиксации, можно заключить,

что первые 6 часов растения данного сорта эффективно сопротивляются патогену при помощи различных защитных систем, связанных, например, ферментами про-/антиоксидантной системы (Яруллина и др., 2021) или белками, блокирующими рецепцию патогенных эффекторов (Veselova et al., 2021).

Обработка семян СК и ЖК, а также их композицией, дифференцированно стимулировало последующее накопление транскриптов генов *SnAGO*, в патогенной системе с обоими сортами пшеницы (Рис. 25). При этом, на фоне активного накопления уровня исследуемых транскриптов были обнаружены различия в экспрессии генов *SnAGO* в зависимости от варианта опыта. Например, гены *SnAGO1* и *SnAGO18* на устойчивом сорте Омская 35 экспрессировались в инфицированных растениях пшеницы, семена которых были обработаны СК, в большей степени, чем под влиянием ЖК. Композиция СК и ЖК более выражено снижала активность генов *SnAGO2* и *SnAGO3*.

В ходе изучения активности транскрипции гена *SnAGO18* были обнаружены различия в уровне его транскриптов у восприимчивого и устойчивого сортов пшеницы. Точно также, как и с другими генами *SnAGO* уровень транскриптов гена *SnAGO18* в листьях устойчивого сорта оказался в 2 раза выше, чем в восприимчивом. СК и ЖК стимулировали накопление транскриптов этого гена в течение эксперимента.

На рисунке 26 представлены данные, по изменению уровня транскриптов гена *SnDCL1*. Как видно, в патогенной системе уровень транскриптов гена *SnDCL1* в ходе развития септориоза стабильно в течение опыта накапливается как в восприимчивом, так и устойчивом сорте. Причем обращает на себя внимание более высокий уровень транскриптов гена *SnDCL1* в листьях устойчивого сорта пшеницы, в сравнении с восприимчивым (Шеин и др. 2022), что соотносится с результатами, наблюдаемыми при анализе активности транскрипции генов *SnAGO* (рис. 25).

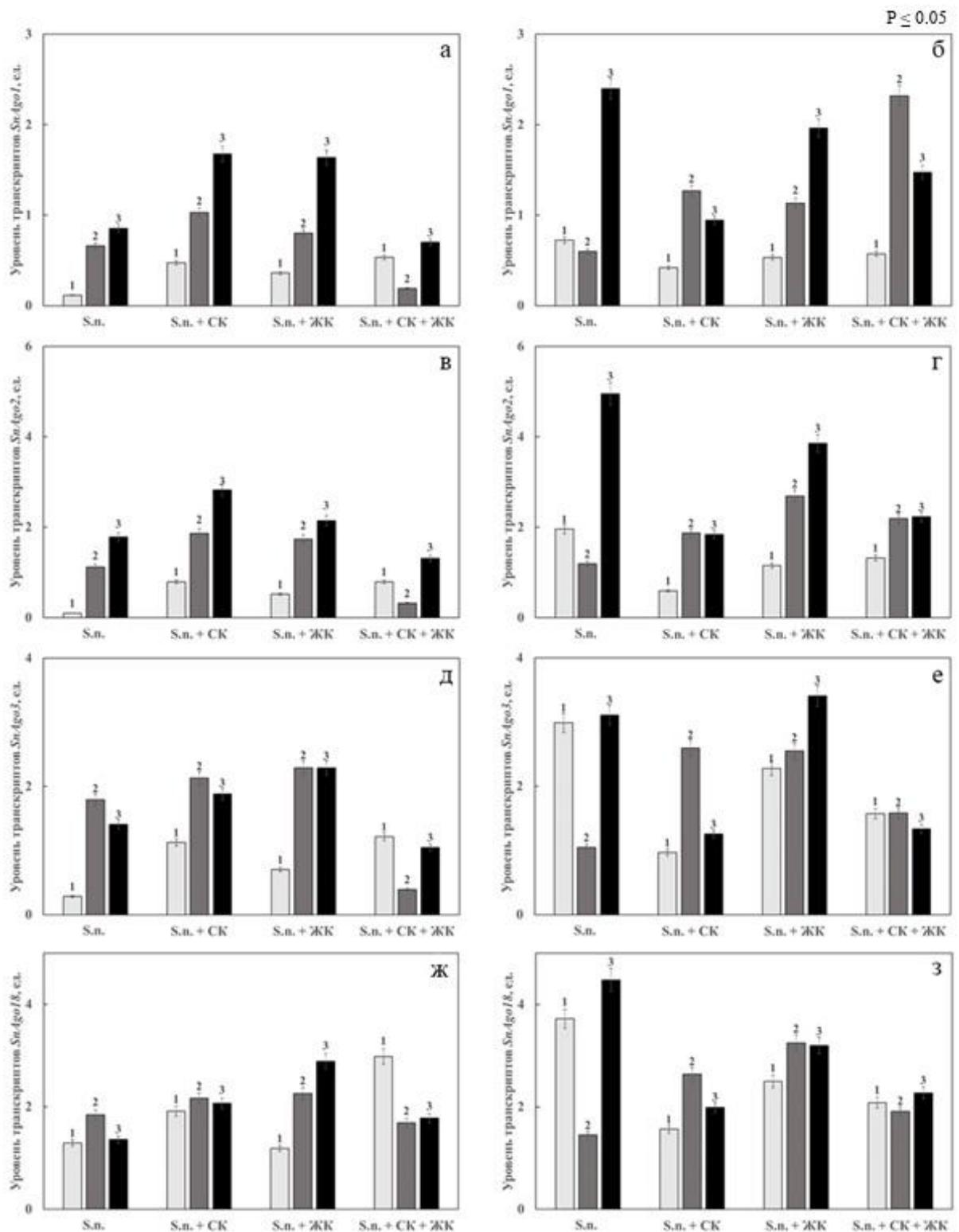


Рисунок 25. Изменение уровня транскриптов генов *SnAGO* системы РНКи у гриба *S. nodorum* при обработке семян растения-хозяина СК и ЖК у восприимчивого сорта Жница (а, в, д, ж) и устойчивого сорта Омская 35 (б, г, е, з) через 6 (1), 24 (2) и 72 (3) часа после инфицирования: а, б – *SnAGO1* (Snog_12157); в, г – *SnAGO2* (Snog_10544); д, е – *SnAGO3* (Snog_10546); ж, з – *SnAGO18* (Snog_12309)

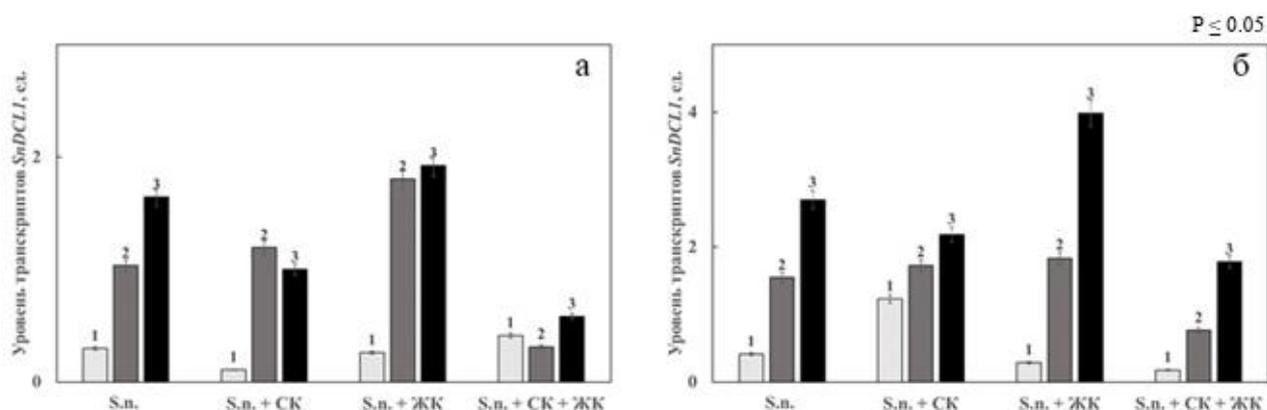


Рисунок 26. Изменение уровня транскриптов гена *SnDCL1* (*Snog_08521*) системы РНКи у гриба *S. nodorum* при обработке семян растения-хозяина СК и ЖК у восприимчивого сорта Жница (а) и устойчивого сорта Омская 35 (б) через 6 (1), 24 (2) и 72 (3) часа после инфицирования

3.7 Активность транскрипции генов системы РНКи у патогенного гриба *S. nodorum* в условиях инфицирования растений пшеницы в норме и после предпосевной инокуляции семян бактериями *B. subtilis* 26Д

Далее нами был проведен анализ поведения генов *SnAGO* и *SnDCL* патогенного гриба *S. nodorum* в патосистеме с контрастными по устойчивости к септориозу сортами мягкой пшеницы Жница (восприимчивый) и Омская 35 (устойчивый), иммунизированных бактериальным штаммом *B. subtilis* 26Д (рис. 27; рис.28). Как видно, уровень транскриптов генов *SnAGO18* (б) и *SnAGO3* (г) у восприимчивого сорта Жница в норме, без обработки штаммом *B.subtilis* 26Д, была значительно выше, чем аналогичная у устойчивого сорта Омская 35. Обработка *B. subtilis* снижала активность транскрипции грибных генов РНКи у обоих сортов, однако из диаграмм видно, что различия у сорта Жница ввиду его восприимчивости к грибным локусам *AGO* выражены гораздо сильнее. Достоверно известно, что развитие защитных реакций растения-хозяина против патогена связано с индукцией активности транскрипции генов, кодирующих PR-белки (van Loon et al., 2006; Pieterse et al. 2009), и что бактериальный штамм *B. subtilis* является одним из таких регуляторов (Ahn et al., 2007; Ahn et al., 2011; Nyakumachi et al., 2013).

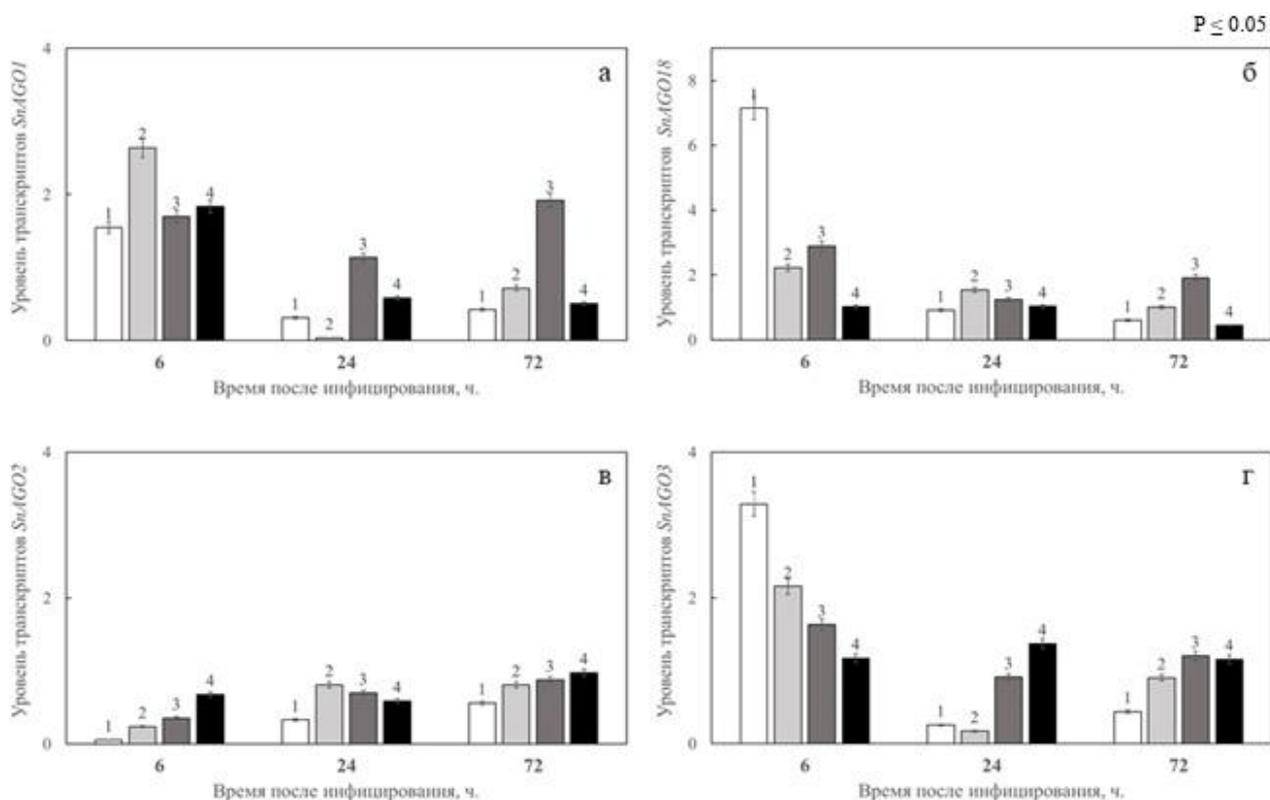


Рисунок 27. Изменение в уровне транскриптов генов *SnAGO1* (а), *SnAGO18* (б), *SnAGO2* (в) и *SnAGO3* (г) системы РНКи у гриба *S. nodorum* при обработке семян пшеницы штаммом *B. subtilis* 26Д: 1 – Жница (инф.); 2 – Омская 35 (инф.); 3 – Жница (инф. + *B. subtilis* 26Д); 4 – Омская 35 (инф. + *B. subtilis* 26Д)

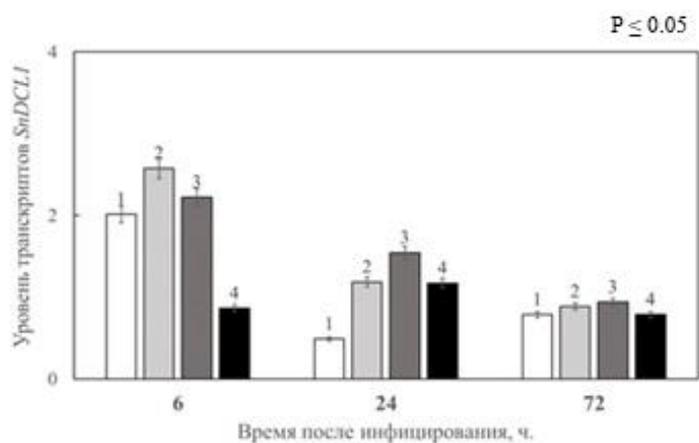


Рисунок 28. Изменение в уровне транскриптов гена *SnDCL1* системы РНКи у гриба *S. nodorum* при обработке семян пшеницы штаммом *B. subtilis* 26Д: 1 – Жница (инф.); 2 – Омская 35 (инф.); 3 – Жница (инф. + *B. subtilis* 26Д); 4 – Омская 35 (инф. + *B. subtilis* 26Д)

Вместе с тем, как упоминалось ранее, одной из функций системы РНКи является подавление активности генов и, в случае с патогенными организмами, преодоление защитной системы растения-хозяина (Weiberg et al., 2013, Shen et al., 2014, Feng et al., 2017, Wang et al., 2018, Jo et al., 2018, Neupane et al., 2019). В совокупности с данными по интенсивности развития и степени поражения контрастных сортов (рис. 2), а также активности транскрипции генов системы РНКи пшеницы (рис. 11, рис. 12), можно полагать, что наблюдаемая картина может объясняться необходимостью подавлять грибные гены РНКи для успешного формирования защитного ответа и неспособностью эффективно делать это без бактериального штамма. Вместе с тем, в отличие от сорта Жница, в эксперименте с устойчивым сортом Омская 35 уровень транскриптов генов РНКи у возбудителя септориоза сохранялась примерно на одном уровне в течение суток после инфицирования, что может являться причиной более поздней (вынужденной) и менее выраженной активации генов, вовлеченных в проявление РНКи у данного сорта и что также соотносится с результатами из рисунков 11 и 12.

3.8 Филогенетический анализ генов *AGO* и *DCL* гриба *S. nodorum*

На рисунке 29 представлены результаты анализа генетического расстояния между различными грибными генами *AGO* и гомологичным им геном *QDE* у видов грибов, а также у некоторых видов растений и животных, рассматриваемых в базе данных FunRNA (<http://funrna.riceblast.snu.ac.kr>) как гомологичные грибным генам модельные объекты. Как можно видеть из рисунка 30, структура одних и тех же генов *AGO* у эукариот имеет большую гомологию, чем структура генов данного семейства у представителей одного и того же рода/таксона. Так, отобранный для анализа ген *AGO1* у гриба *S. nodorum* оказался на одной ветви с генами *AGO1* грибов из других родов или даже отделов, а не с генами *AGO2*, *AGO3* и *AGO18* того же вида. Другим наглядным примером служит расположение на древе растительных и животных генов *AGO*.

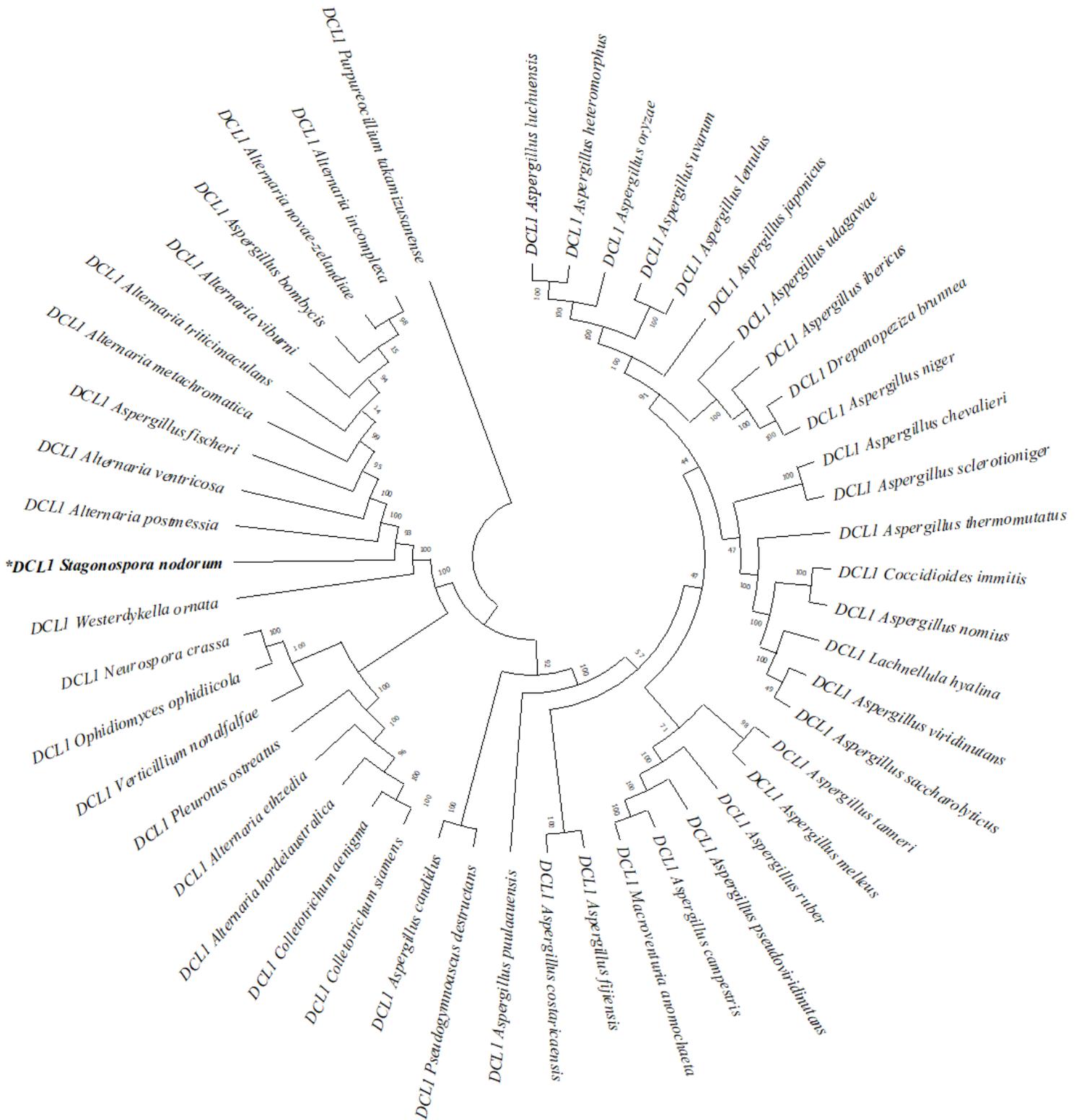


Рисунок 30. Филогенетическое древо генов *DCL* у различных грибов

Как и следовало ожидать, гены *AGO* позвоночных и растений оказались в наибольшем отдалении от проанализированных последовательностей генов грибов на отдельной подветви. Примечательно также, что согласно полученному результату, гены *QDE2*, будучи гомологами *AGO1* (Jo et al., 2018), расположены на совсем другой филогенетической ветви. Подобное выделение *AGO1* в отдельную от *AGO2* и *AGO3* группу подтверждается аналогичными результатами в работах (Zhang et al., 2015; Ahmed et al., 2021).

Исходя из полученного филогенетического древа по гену *DCL1* (рис. 30) видно, что гриб *S. nodorum* выделяется в отдельную ветвь вместе с представителями класса дотидеомицетов (*Dothideomycetes*). Соответственно, локус SNOG_08521 гена *DCL1* у *S. nodorum* имеет большее сродство с аналогичным геном у представителей своего класса, по сравнению с геном *DCL1* рода *Aspergillus*. Сходная видо-специфичность генов семейства *DCL* была показана, например, в работе (Dubey et al., 2020).

ОБСУЖДЕНИЕ

Разнообразие способов питания патогенных грибов способствовало эволюционному формированию различных способов защиты растений от них (McCombe et al., 2022). Например, против биотрофных патогенов, питающихся на живых тканях растений, запускаются механизмы защиты, где активную роль выполняет сигнальный путь, регулирующийся СК и формирующий системную приобретенную устойчивость. ЖК запускает иной сигнальный путь, названный системной индуцированной устойчивостью и защищающий растения от некроторофных патогенов и насекомых. Многочисленными исследованиями показано, что возбудитель септориоза *S. nodorum* характеризуется гемибиотрофным способом питания на растениях пшеницы, сочетающим в себе биотрофную фазу развития в самом начале патогенеза и некротрофную в последствии, но способным и к сапротрофному росту на питательных средах (Oliver et al., 2012). В зависимости от сроков развития патогена в тканях растений, защитные системы растения-хозяина должны четко распознавать эти переходные этапы. Поэтому оценка механизмов формирования устойчивости растений к патогенам также является актуальной задачей, решение которой может позволить эффективно регулировать адаптивный потенциал культур и добиваться более высоких продуктивных свойств. В связи с этим, особый интерес представляет возможность эффективной оценки степени развития патогенов в тканях растений с использованием молекулярно-биологических и/или иммунологических методов, оценивающий уровень накопления в тканях нуклеиновых кислот или белков патогена, так как визуальная оценка болезни часто сопряжена с субъективностью и подвержена воздействию различных внешних факторов.

РНКи, в свою очередь, представляет уникальный и древний механизм защиты генома эукариот, в том числе растений и грибов, от чужеродной генетической информации и регуляции физиологических процессов в них. Наиболее важными компонентами этого относительно сложного механизма иммунитета являются рибонуклеазы AGO и DCL, функционально

охарактеризованные на модельных организмах (Choi et al., 2014). На сегодняшний день идентифицированы уже тысячи коротких регуляторных РНК, а само явление РНКи на отдельных растительных объектах, например, на арабидопсисе, подробно изучен. Например, показано формирование совместимости между хозяином и патогеном с участием растительных белков AGO1 *Brassica napus* в условиях инфицирования растений грибами *Verticillium dahliae* и *Verticillium longisporum*, пропадающее в растениях с подавленной их экспрессией (Shen et al., 2014). В растениях томата и арабидопсиса микроРНК, секретируемые грибом *B. cinerea*, использовали хозяйские белки AGO1 для избирательного подавления трансляции хозяйских митоген-активируемых протеинкиназ (MAPKs), пероксиредоксина, а также ассоциированной с клеточной стенкой киназы, а подавление накопления этого белка в мутантных растениях арабидопсиса приводил к снижению их восприимчивости к грибу (Weiberg et al., 2013). Dunker с сотрудниками (2020) на растениях арабидопсиса показали, что подобное рекрутирование хозяйского белкового комплекса AGO1 характерно и для оомицета *Hyaloperonospora arabidopsidis*, филогенетически далекого от грибов патогена, что предполагает общее для патогенов свойство.

Вместе с тем, механизмы работы РНКи в патосистеме между растением и грибом пока изучены недостаточно, что ограничивает наше понимание этого механизма. Недостаточно изучен и механизм работы РНКи в системах с симбиотами и эндофитами, как, например, в системе «растение-бактерия-патоген». В некоторых работах имеются данные об успешном встраивании дцРНК в геном бактерий рода *Bacillus* и положительной роли этих трансформированных штаммов против вирусных патогенов (Riet et al., 2021) и насекомых-вредителей (Jiang et al., 2022). Однако мало известно о влиянии различных индукторов защитного ответа на активацию компонентов РНКи растения-хозяина. В актуальных базах данных практически отсутствуют работы, где бы обсуждалось поведение генов патогена *S. nodorum*, кодирующих белки ответственные за РНКи, в условиях непосредственного

воздействия на них эндофитных бактерий, биостимуляторов, индукторов устойчивости, например, СК и ЖК, или косвенного воздействия через инфицирование растений в условиях развития септориоза. Имеется ряд противоречивой информации о роли индукторов устойчивости растений в процессе работы РНКи при формировании фитоиммунных процессов в тканях растений под непосредственным воздействием СК и ЖК и в ответ на инфицирование патогенами. Например, некоторые авторы показывают, что СК-индуцированная устойчивость к патогенам затрагивает механизмы растительной РНКи только через хозяйскую РНК-зависимую РНК-полимеразу (RDR1) и координируется этим белком (Lee et al., 2016). В то же время есть информация, где показано, что в растениях, например, риса уровни экспрессии генов *OsAGO1a*, *OsAGO2* и *OsAGO18* оказались связаны с ЖК и в мутантных растениях риса *co1-13*, не способных передавать сигналы ЖК, были ниже, чем у диких растений (Yang et al., 2013). Особо интересно это в связи с тем, что у патогенного гриба пшеницы *S. nodorum* роль белковых компонентов явления РНКи в патогенности все еще остается нерешенной. Вместе с тем, недавно проведенный анализ участия белковых компонентов РНКи в развитии патогенности *Zymoseptoria tritici* – другого гриба, вызывающего септориоз листьев на пшенице, после нокаутирования в его геноме генов *AGO1* и *AGO2* (Kettles et al., 2019; Ma et al., 2020) не обнаружил качественных фенотипических изменений в развитии симптомов септориоза на восприимчивом сорте пшеницы Bobwhite. Мутантные по генам *AGO* штаммы грибов свойств вирулентности в отношении растений пшеницы не теряли. Из полученных результатов авторы делают вывод, что они не играют значительной роли в процессах развития септориоза. Вместе с тем, анализ экспрессионного статуса генов, ответственных за работу явления РНКи патогенного гриба *Verticillium nonalfalfae*, вызывающим увядание у хмеля (*Humulus lupulus L.*) показал, что более вирулентные штаммы патогена обладают более высоким уровнем накопления транскриптов *VnAGO* (Jeseničnik et al., 2019). Liu с сотр. (2021) обнаружили, что экзогенная ЖК

ингибирует у гриба *Magnaporthe oryzae* удлинение зародышевой трубки и запускает развитие аппрессорий - структур грибного мицелия, ответственных за проникновение в клетки растения путем деления сигнального пути с цАМФ, с последующим вызовом изотропного роста мицелия во время развития в условиях взаимодействия с клетками растений. Выявлена важная роль компонентов явления РНКи патогена в их росте и развитии, естественно отражающиеся в последствии в их способности инфицировать растения. Так, мутанты Δ ago1 гриба *Colletotrichum higginsianum* демонстрировали серьезные дефекты в морфологии конидий (Campo et al., 2016). Делеция гена *FgAGO2* гриба *Fusarium graminearum*, отвечающих за прохождение стадии споруляции и созревание аскоспор (Zeng et al., 2018), не влияла на фенотип гриба во время бесполой фазы (Chen et al., 2015). Вместе с тем, грибы *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* 4287 при подавлении гена *FoQDE-2 (AGO1)* (Jo et al., 2018) проявляли пониженную вирулентность. Ранее было показано, что высоковирулентный штамм гриба *S. nodorum* SnB может преодолеть защиту пшеницы, связанную с про-/антиоксидантной защитной системой путем активации каталаз (Трошина и др., 2010) и хитиндезацетилаз (Maksimov et al., 2011), а также выработки различных эффекторных молекул (Veselova et al., 2021).

Бесспорно, очень многое в этой области еще предстоит исследовать. Например, мало известно о роли РНКи в регуляции защиты низших наземных форм растений и водорослей от патогенов, а также ее роли во взаимоотношениях между растениями и паразитарными формами растений. Остаются нераскрытыми физиологические механизмы взаимодействия РНКи с классическими сигнальными фитоиммунными системами, ответственными за системную устойчивость и регулирующимися СК и ЖК. Но, можно полагать, что явление РНКи в растительных клетках функционирует независимо от индуцируемых ПАМП сигнальных систем защиты и относительно нечувствительны к таким низкомолекулярным сигнальным молекулам как ЖК и СК, активные формы кислорода, ионы кальция и другие

вторичные мессенджеры. Потенциалом для исследований может быть также оценка работы явления РНКи в условиях формирования многоуровневого фитоголобионта, состоящего, как минимум, из растения, патогена и эндофита и/или симбионта как, например, в системе “хозяин – патоген – эндофитная бактерия” (Рис. 31).

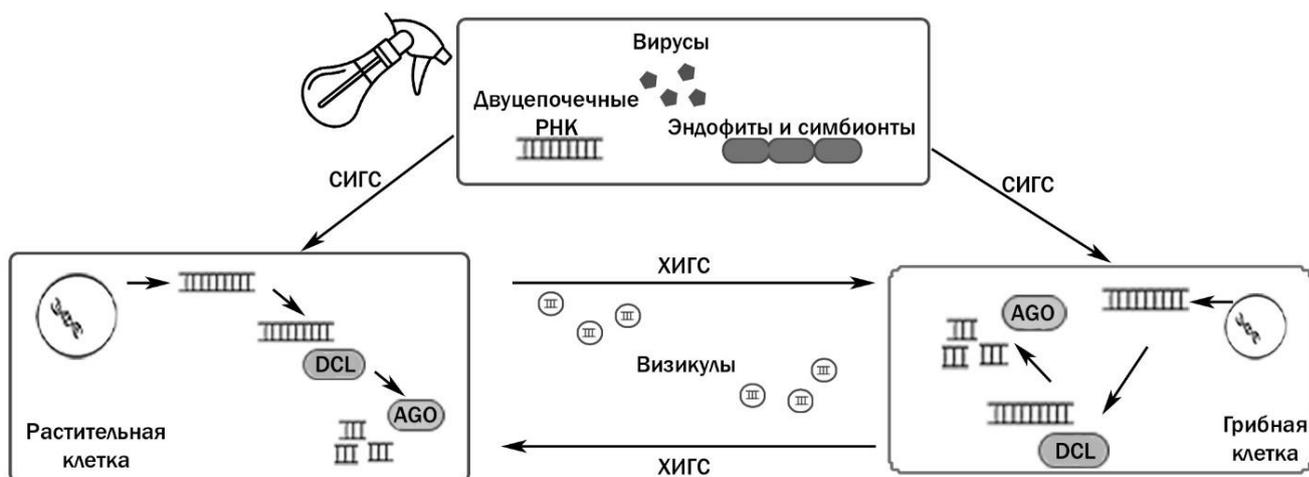


Рисунок 31. Схема взаимодействия компонентов системы РНК-интерференции у различных организмов в патосистеме и перспективы регулирования ее работы с использованием биостимуляторов и искусственных микроРНК

С одной стороны, поскольку явление РНКи естественно и эффективно работает во всех таксонах живых организмов, предполагается, что фитопатогены (вирусы, бактерии, грибы и оомицеты) и насекомые-вредители такую защитную систему легко обойти не смогут.

Данные по функционированию явления РНКи в растениях позволят разработать весьма эффективные стратегии борьбы с комплексом патогенов и вредителей в агроценозе, способствующие повышению урожайности сельскохозяйственных культур, избегая при этом применения экологически опасных пестицидов. Возможность молекулярного переключения (активации) генов устойчивости к заболеваниям, индуцированное хозяином глушение генов патогена и даже вредителя также предоставляет возможность для

разработки нового поколения пестицидов на основе фитогормонов, биопрепаратов на основе живых эндофитных бактерий и искусственных дцРНК. Особо следует отметить то, что технологии регуляции численности вредителей, патогенов и вирусов в агроценозе могут быть осуществлены как путем классического внедрения векторов с кассетами РНКи в геном растений и регулирования работы природных механизмов ХИГС, так и использованием дцРНК в виде спреев непосредственно для обработки растений или привлечения эндофитов, как генераторов РНКи.

Таким образом, экзогенное применение фитогормонов, биопрепаратов и искусственных дцРНК с потенциалом запуска РНКи является мощным инструментом для обеспечения защиты растений и улучшения урожая, для устойчивого решения текущих сельскохозяйственных проблем. При явном положительном защитном эффекте фитогормонов, биопрепаратов и искусственных дцРНК в экспериментальных условиях, остаются вопросы по подбору биостимуляторов, способствующих продуцированию антипатогенных дцРНК и использования в полевых условиях для защиты растений от патогенов и вредителей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные молекулярные и биохимические исследования супрессоров фитоиммунных реакций различного происхождения значительно расширили представления о всей сложности процесса РНК-интерференции, а также заметно углубили наше понимание природы взаимоотношений между растениями и патогенами (Шеин, Максимов, 2018). Показано, что явление РНКи в системе иммунитета эукариот, при взаимодействии хозяев со своими патогенами, является «обоюдоострым инструментом», с одной стороны защищающим хозяина от патогена, а с другой, способствующий отключению патогеном накопления наиболее существенных ключевых защитных белков хозяина, в целях использования его ресурсов для своего функционирования. Так, патогенные грибы могут посылать микроРНК в растения, чтобы ингибировать активность генов иммунного ответа у растения-хозяина (Werner et al., 2021). Но, точно также, и растения могут делегировать свои микроРНК в клетки патогена для нарушения экспрессии генов вирулентности (Zhang et al., 2016 (A)).

В данной работе мы провели анализ активности транскрипции генов *AGO* и *DCL* вовлеченных в РНКи у контрастных по устойчивости к септориозу сортов мягкой пшеницы Жница и Омская 35, а также у вирулентного штамм *SnB* патогенного гриба *S. nodorum* в норме и в условиях иммунизации растений СК и ЖК, а также спорами эндофитной бактерии *B. subtilis* 26Д. Для оценки степени развития септориоза нами был использован метод оценки накопления патогенного генетического материала в тканях растений путем сравнения соотношения уровня транскриптов генов домашнего хозяйства (кДНК) гриба *SnTUB* и пшеницы *TaRLI*, результаты которого подтвердили полученные данные по визуальному наблюдению развития болезни на листьях, но в более ранние сроки.

В ходе эксперимента мы наблюдали активацию генов *AGO* и *DCL* у восприимчивого сорта на ранних этапах инфицирования и фоне слабо выраженной активности соответствующих грибных генов. В тоже время,

накопление транскриптов генов *AGO* и *DCL* патогенного гриба *S. nodorum* в тканях листа устойчивого к патогену сорта пшеницы Омская 35, напротив, было более выраженным, чем в листьях восприимчивого сорта Жница, что может свидетельствовать о вовлеченности изученных генов в преодолении защитной системы растения-хозяина в динамичной системе, а также возможность непосредственной регуляции активности генов патогена в зависимости от степени устойчивости хозяина. Это предположение подтверждается в вариантах эксперимента, где растения были иммунизированы путем предварительной предпосевной обработки семян СК и ЖК, а также их композицией. На восприимчивом сорте пшеницы Жница наблюдалось стабильное накопление транскриптов генов *TaAGO1*, *TaAGO4* и *TaDCL2* во времени, в то время как уровень транскриптов этих генов у устойчивого сорта Омская 35 сохранялся примерно на уровне контрольных значений и изменялся гораздо менее выражено лишь на 24-часовой точке фиксации. В тоже время, при изменении в активности транскрипции генов РНКи у патогенного гриба наблюдалась обратная тенденция: менее выраженное и постепенное накопление транскриптов *AGO* и *DCL* патогена на восприимчивом сорте Жница и гораздо более активное накопление транскриптов генов РНКи на устойчивом сорте Омская 35 с низким их количеством на 24-часовой точке фиксации. Примечательно и то, что содержание транскриптов генов РНКи гриба на устойчивом сорте было выше, чем в контрольных образцах, хотя, судя по соотношению генов домашнего хозяйства *SnTUB/TaRLI* (рис. 3), содержание биомассы фитопатогена у устойчивого сорта было значительно ниже, особенно в иммунизированных СК и ЖК растениях.

Интересные результаты были получены и при оценке активности транскрипции генов фитопатогенной РНКи после непосредственного воздействия СК и ЖК на рост мицелия гриба в культуре. Высокие концентрации СК, по сравнению с низкими, усиливали накопление транскриптов всех исследуемых генов РНКи системы гриба в более ранние

сроки культивирования. Аналогичным образом, добавление ЖК также стимулировала накопление транскриптов *SnAGO1*, *SnAGO3*, *SnAGO18* и *SnDCL1*, однако различия в активности транскрипции в зависимости от концентрации добавляемого раствора ЖК были менее выраженными, чем в случае с СК. Эти данные могут свидетельствовать о влиянии СК и ЖК на работу генов *AGO* и *DCL* у *S. nodorum* во время роста, а также о регуляторной роли системы РНКи в самом процессе грибного онтогенеза.

Анализ активности транскрипции генов *AGO* и *DCL* у растения-хозяина и возбудителя септориоза в условиях инокуляции бактериальным штаммом *Bacillus subtilis* 26Д также подтвердил активацию процесса РНКи в процессе патогенеза. Была выявлена взаимосвязь исследуемых генов у растения и фитопатогена в патосистеме. Из полученных результатов видно, что, несмотря на раннюю активацию у восприимчивого сорта Жница растительной РНКи в условиях инфицирования, защитный эффект в результате был незначительным (рис. 2, 3) а количество транскриптов грибных генов *SnAGO3* и *SnAGO18* был значительно выше, чем, например, у устойчивого сорта Омская 35. Предобработка семян восприимчивого сорта бактериальным штаммом впоследствии многократно увеличивала активность генов *TaAGO1*, *TaAGO2*, *TaDCL2* и *TaDCL4*, а также снижала уровень транскриптов генов РНКи гриба (Шеин и др., 2021). Кроме того, данные результаты позволили подтвердить полученные ранее в нашей лаборатории данные о роли бактериального штамма *B. subtilis* 26Д, как эффективного индуктора защитного ответа у растений пшеницы против гриба *S. nodorum*.

Секвенирование фрагментов гена *TaAGO1* у контрастных по устойчивости к септориозу сортов пшеницы Жница и Омская 35 позволило установить их положение на филогенетическом древе и оценить геномную реализацию процесса РНКи. Было показано, что основной вклад в реализации гена *TaAGO1* у мягкой пшеницы вносится копией данного гена на хромосоме 7D, что соотносится с литературными данными о роли генома D пшеницы в обеспечении адаптивного потенциала некоторых генетических систем

растения (Романов и др., 2018), в том числе связанных с иммунной реакцией на инфицирование патогенным грибом. Полученные результаты свидетельствуют о ключевой роли именно этой копии гена *TaAGO1* в реализации процесса РНКи у мягкой пшеницы. Кроме того, была выявлена однонуклеотидная замена в последовательности гена *TaAGO1* у восприимчивого сорта Жница, ведущая к замене аминокислоты Пролина на Серин.

ВЫВОДЫ

1. Быстрый ответ генов мягкой пшеницы, кодирующих белки семейств AGO и DCL, вовлеченные в функционирование явления РНК-интерференции пшеницы, на инфицирование возбудителем септориоза *Stagonospora nodorum* Berk. предполагает активное участие этих генов в формировании защитной системы растения пшеницы.

2. Предложена возможность использования показателя уровня транскриптов референсного гена патогена (*SnTUB*) по отношению к уровню транскриптов соответствующего гена растения-хозяина (*TaRLI*) для оценки устойчивости сортов к возбудителю септориоза *S. nodorum*, а также оценки иммунизирующего эффекта на растения низкомолекулярных индукторов различной природы (СК и ЖК) и эндофитных бактерий (*B. subtilis* 26Д).

3. Впервые показано воздействие иммунной системы растений пшеницы на активность транскрипции генов *SnAGO1* и *SnAGO2* у патогенного гриба *S. nodorum* с использованием контрастных по устойчивости к патогену сортов пшеницы, индукторов различной природы (СК и ЖК) и эндофитных бактерий (*B. subtilis* 26Д).

4. Повышение активности транскрипции генов семейств AGO и DCL у мягкой пшеницы и снижение активности этих же генов у патогенного гриба в условиях инокуляции растений бактериальным штаммом *B. subtilis* 26Д, предполагает вовлечение эндофита в регуляцию явления РНКи в качестве защитного механизма против патогена.

5. Высокая гомология нуклеотидной последовательности кДНК консервативного домена PIWI гена AGO1 у исследованных сортов пшеницы с таковой *Ae. tauchii*, а также положение генов на филогенетическом древе, свидетельствуют о более весомой доле хромосомы 7D в геномной реализации экспрессии этого гена у мягкой пшеницы в ответ на инфицирование фитопатогенным грибом *S. nodorum*.

6. Секвенирование фрагментов ДНК гена, кодирующего белок AGO1, у контрастных по устойчивости к возбудителю септориоза сортов пшеницы

позволило обнаружить различия в структуре гена между сортами, проявляющимися, в последствии, в замене Пролина на Серин в аминокислотной последовательности в положении 855 и, соответственно, в изменениях структуры белковой молекулы.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

кДНК – кодирующая белки дезоксирибонуклеиновая кислота;

ПААГ – полиакриламидный гель;

ПЦР – полимеразно-цепная реакция;

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;

РНКи – РНК-интерференция (RNAi – RNA interference);

киРНК – короткие интерферирующие РНК (siRNA – small interference RNA);

дцРНК – двуцепочечные РНК;

оцРНК – одноцепочечные РНК;

СЗР – средства защиты растений;

СИУ – системная индуцированная устойчивость (ISR - induced systemic resistance);

СПУ – системная приобретенная устойчивость (SAR – systemic acquired resistance);

СК – салициловая кислота;

ЖК – жасмоновая кислота;

ХИГС – хозяин-индуцированный генный сайленсинг (HIGS – Host Induced gene silencing);

СИГС – спрей-индуцированный генный сайленсинг (SIGS – Spray Induced gene silencing);

S.n./Sn – *Staganospora nodorum*;

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурханова Г. Ф. Бактерии рода *Bacillus* в регуляции устойчивости пшеницы к *Septoria nodorum* Berk / Г. Ф. Бурханова, С. В. Веселова, А. В. Сорокань, Д. К. Благова, Т. В. Нужная, И.В. Максимов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53. – №. 3. – С. 308-315.
2. Бурханова Г. Ф. Участие редокс-чувствительных транскрипционных факторов в защите растений пшеницы при развитии септориоза / Г. Ф. Бурханова, С. В. Веселова, Т. В. Нужная, И. В. Максимов // Proceedings of the second international symposium molecular aspects of plant redox metabolism and the international scientific school the role of reactive oxygen species in plant life. – 2017. – С. 83-87.
3. Максимов И. В. РНК-интерференция в защите растений от грибной и оомицетной инфекции / И. В. Максимов, М. Ю. Шеин, Г. Ф. Бурханова // Прикладная биохимия и микробиология, 2023, Т. 59, № 3, стр. 219-234 (английская версия: V. 58., P. S16-S31)
4. Максимов И. В. Связь агрессивности возбудителя септориоза пшеницы *Septoria nodorum* Berk. с активностью каталазы / И. В. Максимов, Л. Г. Яруллина, Г. Ф. Бурханова, Е. А. Заикина // Изв. РАН. Сер. биол. – 2013. – Т. 5. – С. 558-564.
5. Максимов И. В., Эндوفитные бактерии и фитоиммунитет / И. В. Максимов, М. Ю. Шеин, Р.М. Хайруллин // Материалы 2-ой Международной научной конференции PLAMIC2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» 5-9 октября 2020 г., Саратов., отв. Ред. И.А. Тихонович – 2020, – С. 160.
6. Максимов И.В. РНК-интерференция в защитных системах растений РНК-интерференция в защитных системах растений / И.В. Максимов, М.Ю. Шеин, Г.Ф. Бурханова // Физиология растений, 2021, том 68, No 4, стр. 356-370. (английская версия: V. 68, P. 613–625)
7. Максимов, И. В. Эндифиты и защита растений от биотического стресса: перспективы создания биопрепаратов нового поколения / И. В.

Максимов, С. В. Веселова, М. Ю. Шеин, Р. М. Хайруллин // Труды Кубанского государственного аграрного университета 2022, выпуск 98, стр. 98-104.

8. Маниатис Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук // М. Мир, – 1984. – С. 480

9. Марченкова А.А. Устойчивость яровой пшеницы к септориозу / А.А. Марченкова, Э.Д. Неттевич, Т.Ю. Тушинский // Вест. с.-х. науки. 1991. № 7. С. 110–115.

10. Полевой В. В. Практикум по росту и устойчивости растений / В. В. Полевой, Т. В. Чиркова, Л. А. Лутова, // СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та. – 2001.

11. Пыжикова, Г.В. Методика изучения возбудителя септориоза на изолированных листьях пшеницы / Г.В. Пыжикова, Е.В. Карасева // С.-х. биология. – 1985. – № 12. – С. 112-114.

12. Романов Б. В. Феномогеномика продукционных признаков видов пшеницы: монография / Б. В. Романов, К.И. Пимонов // Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Донской государственный аграрный университет": Донской ГАУ, 2018. – 188 с.

13. Санина, А.А. Способы выделения и хранения возбудителей септориоза пшеницы / А.А. Санина, Л.В. Анциферова // Микология и фитопатология – 1989. – Т. 23. – С. 172-175.

14. Третьякова П. Я. Малые РНК в защите растений от болезней / П. Я. Третьякова, А. А. Соловьев // Экологическая генетика. – 2020. – Т. 18. – №. 4. – С. 467-482.

15. Чеботарь В. К. Эндوفитные бактерии как перспективный биотехнологический ресурс и их разнообразие / В. К. Чеботарь, А. В. Щербаков, Е.Н. Щербакова, С. Н. Масленникова, А. Н. Заплаткин, Н. В. Мальфанова // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – №. 5. – С. 648-654.

16. Шеин М. Ю. Влияние салициловой и жасмоновой кислот на транскрипционную активность генов *TADCL2* и *TADCL4* в растениях

пшеницы при инфицировании грибом *Stagonospora nodorum* / Шеин М. Ю., Бурханова Г. Ф., Максимов И. В. // ЭкоБиоТех 2021. – 2021. – С. 172-175.

17. Шеин М. Ю. Изменение транскрипционной активности генов *TAAGO2* и *TAAGO4* в растениях пшеницы при инфицировании грибом *Stagonospora nodorum* Berk / М.Ю. Шеин, Г.Ф. Бурханова, А.Ю. Мерзлякова, И.В. Максимов // Труды Кубанского государственного аграрного университета 2021, выпуск 92, стр. 196-200.

18. Шеин М. Ю. Изменения активности генов *DCL* и *AGO* в растениях пшеницы инфицированных *Stagonospora nodorum* BERK и при обработке бактериями *Vacillus* spp. / М. Ю. Шеин, Г. Ф. Бурханова, И. В. Максимов // Сборник материалов II Международной научно-практической конференции «Современные подходы и методы в защите растений», Екатеринбург, 16–18 ноября 2020 г., стр. 96-97.

19. Шеин М. Ю. РНК-интерференция в иммунитете растений / М. Ю. Шеин, И. В. Максимов // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные подходы и методы в защите растений» Екатеринбург, 12-14 ноября 2018 г., стр. 115-117.

20. Шеин М.Ю., Бурханова Г.Ф., Максимов И.В. Изменение транскрипционной активности генов системы РНК-интерференции гриба *Stagonospora nodorum* Berk в патогенной системе в условиях индуцирования фитоиммунитета / Шеин М.Ю., Бурханова Г.Ф., Максимов И.В. // Материалы 3-й Международной научной конференции PLAMIC2022 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» 3-8 октября 2022 г., Санкт-Петербург / отв. Ред. И.А. Тихонович – 2022 – с. 239

21. Шеин М. Ю. Влияние бактериальных штаммов на транскрипционную активность генов системы РНК-интерференции на растениях пшеницы (*Triticum*) при инфицировании возбудителем септориоза / М. Ю. Шеин, Г. Ф. Бурханова, И. В. Максимов // Материалы 2-ой Международной научной конференции PLAMIC2020 «Растения и

микроорганизмы: биотехнология будущего» 5-9 октября 2020 г., Саратов / отв. Ред. И. А. Тихонович – 2020, с. 222.

22. Шейн М. Ю. Влияние инфицирования грибом *Stagonospora nodorum* на транскрипционную активность гена *Ago1* в растениях пшеницы / М. Ю. Шейн, А. Ю. Мерзлякова, Г. Ф. Бурханова, И. В. Максимов // Сборник статей Международной научно-практической конференции World science: Problem and innovations. г. Пенза, 28 февраля 2021 г., стр. 62-65.

23. Шейн М. Ю. Роль РНК-интерференции в формировании защитных систем растения пшеницы (*Triticum*) / М. Ю. Шейн, Г. Ф. Бурханова, И. В. Максимов // IX Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений-основа создания растений будущего». – 2019. – стр. 478-478.

24. Щербань А. Б. Вклад *Tu3-gypsy-ретротранспозона Lila* в специфичность D-генома мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L / А. Б. Щербань, И. Г. Адонина, Е. А. Салина // Молекулярная биология. – 2012. – Т. 46. – №. 4. – С. 584-584.

25. Яруллина Л. Г. влияние комплекса эндофитных бактерий *Bacillus* с салициловой и жасмоновой кислотами на состояние про-/антиоксидантной системы растений и устойчивость картофеля при инфицировании возбудителем фитофтороза в стрессовых условиях / Л. Г. Яруллина, Е. А. Черепанова, В. О. Цветков, Г. Ф. Бурханова, А. В. Сорокань, Е. А. Заикина, Ж. Н. Калацкая, Н. В. Балюк, // Экобиотех. – 2021. – Т. 4. – №. 2. – С. 135-142.

26. Яруллина Л. Г. салициловая и жасмоновая кислоты в регуляции про-антиоксидантного статуса листьев пшеницы при инфицировании *Septoria nodorum* Berk / Л. Г. Яруллина, Н. Б. Трошина, Е. А. Черепанова, Е. А. Заикина, И. В. Максимов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011 – Т. 47. – №. 5. – С. 602-608.

27. Acevedo-Garcia J. mlo-based powdery mildew resistance in hexaploid bread wheat generated by a non-transgenic TILLING approach / J. Acevedo-Garcia,

D. Spencer, H. Thieron, A. Reinstädler, K. Hammond-Kosack, A. L. Phillips, R. Panstruga // *Plant biotechnology journal*. – 2017. – V. 15. – №. 3. – P. 367-378.

28. Ahmed F. F. Genome-wide identification of *DCL*, *AGO* and *RDR* gene families and their associated functional regulatory elements analyses in banana (*Musa acuminata*) / F. F. Ahmed, M. I. Hossen, M. A. R. Sarkar, J. N. Konak, F. T. Zohra, M. Shoyeb, S. Mondal // *PloS one*. – 2021. – V. 16. – №. 9. – P. e0256873.

29. Ahn I. P. Priming by rhizobacterium protects tomato plants from biotrophic and necrotrophic pathogen infections through multiple defense mechanisms / I. P. Ahn, S. W. Lee, M. G. Kim, S. R. Park, D. J. Hwang, S. C. Bae // *Molecules and cells*. – 2011. – V. 32. – P. 7-14.

30. Ahn I. P. Rhizobacteria-induced priming in Arabidopsis is dependent on ethylene, jasmonic acid, and NPR1 / I. P. Ahn, S. W. Lee, S. C. Suh // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2007. – V. 20. – №. 7. – P. 759-768.

31. Alamillo J. M. Salicylic acid-mediated and RNA-silencing defense mechanisms cooperate in the restriction of systemic spread of plum pox virus in tobacco / J. M. Alamillo, P. Saénz, J. A. García // *The Plant Journal*. – 2006. – V. 48. – №. 2. – P. 217-227.

32. Alazem M. Interplay between ABA signaling and RNA silencing in plant viral resistance / M. Alazem, N. S. Lin // *Current Opinion in Virology*. – 2020. – V. 42. – P. 1-7.

33. Alekseev V. Yu. Lipopeptide producing endophytic bacteria of genus *Bacillus* in the regulation of the expression of genes involved in the defense response of wheat against greenbug aphid *Schizaphis graminum* / V. Yu. Alekseev, M. Yu. Shein, S. V. Veselova, G. F. Burkhanova, I. V. Maksimov // The 6th international Scientific Conference “Plant genetics, genomics, bioinformatics and biotechnology” (PlantGene2021) Novosibirsk, 14-18 June 2021, - P. 22.

34. Álvarez-Sánchez A. R. Production of specific ds RNA against white spot syndrome virus in the yeast *Yarrowia lipolytica* / A. R. Álvarez-Sánchez, C. Romo-Quinones, R. Rosas-Quijano, A. G. Reyes, A. Barraza, F. Magallón-Barajas,

C. Angulo, C. H. Mejía-Ruíz // *Aquaculture Research*. – 2018. – V. 49. – №. 1. – P. 480-491.

35. Andrade C. M. Host-induced gene silencing in the necrotrophic fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* / Andrade, C. M., Tinoco, M. L. P., Rieth, A. F., Maia, F. C. O., & Aragão, F. J. L. // *Plant Pathology*. – 2016. – V. 65. – №. 4. – P. 626-632.

36. Astier-Manifacier S. RNA-dependent RNA polymerase in Chinese cabbage / S. Astier-Manifacier, P. Cornuet // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*. – 1971. – V. 232. – №. 3. – P. 484-493.

37. Bazin J. miR396 affects mycorrhization and root meristem activity in the legume *Medicago truncatula* / J. Bazin, G. A. Khan, J. P. Combier, P. Bustos-Sanmamed, J. M. Debernardi, R. Rodriguez, C. Sorin, J. Palatnik, C. Hartmann, M. Crespi, C. Lelandais-Brière // *The Plant Journal*. – 2013. – V. 74. – №. 6. – P. 920-934.

38. Biedenkopf D. Systemic spreading of exogenous applied RNA biopesticides in the crop plant *Hordeum vulgare* / D. Biedenkopf, T. Will, T. Knauer, L. Jelonek, A. C. U. Furch, T. Busche, A. Koch // *ExRNA*. – 2020. – V. 2. – №. 1. – P. 1-10.

39. Borah M. RNAi Technology: A novel platform in crop protection / M. Borah, N. C. Konakalla // *Emerging Trends in Plant Pathology*. – 2021. – P. 561-575.

40. Brosseau C. Natural variation in the Arabidopsis *AGO2* gene is associated with susceptibility to potato virus X / C. Brosseau, A. Bolaji, C. Roussin-Léveillé, Z. Zhao, S. Biga, P. Moffett // *New Phytologist*. – 2020. – V. 226. – №. 3. – P. 866-878.

41. Caarls L. How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling / L. Caarls, C. M. J. Pieterse, S. C. Van Wees // *Frontiers in plant science*. – 2015. – V. 6. – P. 170.

42. Cai Q. et al. Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes / Q. Cai, L. Qiao, M. Wang, B. He, F. M. Lin,

J. Palmquist, S. Huang, H. Jin // *Science*. – 2018. – V. 360. – №. 6393. – P. 1126-1129.

43. Cambiagno D. A. Convergent epigenetic mechanisms avoid constitutive expression of immune receptor gene subsets / D. A. Cambiagno, J. R. Torres, M. E. Alvarez // *Frontiers in Plant Science*. – 2021. – V. 12. – P. 703667.

44. Campo S. Small RNA-based antiviral defense in the phytopathogenic fungus *Colletotrichum higginsianum* / S. Campo, K. B. Gilbert, J. C. Carrington // *PLoS pathogens*. – 2016. – V. 12. – №. 6. – P. e1005640.

45. Cao J. Y. Tight regulation of the interaction between *Brassica napus* and *Sclerotinia sclerotiorum* at the microRNA level / J. Y. Cao, Y. P. Xu, L. Zhao, S. S. Li, X. Z. Cai // *Plant Molecular Biology*. – 2016. – V. 92. – P. 39-55.

46. Carbonell A. Antiviral roles of plant ARGONAUTES / A. Carbonell, J. C. Carrington // *Current opinion in plant biology*. – 2015. – V. 27. – P. 111-117.

47. Casacuberta J. M. Biotechnological uses of RNAi in plants: risk assessment considerations / J. M. Casacuberta, Y. Devos, P. Du Jardin, M. Ramon, H. Vaucheret, F. Nogué // *Trends in Biotechnology*. – 2015. – V. 33. – №. 3. – P. 145-147.

48. Chen W. Host-induced silencing of *Fusarium culmorum* genes protects wheat from infection / W. Chen, C. Kastner, D. Nowara, E. Oliveira-Garcia, T. Rutten, Y. Zhao, H. B. Deising, J. Kumlehn, P. Schweizer // *Journal of experimental botany*. – 2016. – V. 67. – №. 17. – P. 4979-4991.

49. Chen Y. Characterization of RNA silencing components in the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum* / Y. Chen, Q. Gao, M. Huang, Y. Liu, Z. Liu, X. Liu, Z. Ma // *Scientific reports*. – 2015. – V. 5. – №. 1. – P. 1-13.

50. Cheng W. Host-induced gene silencing of an essential chitin synthase gene confers durable resistance to *Fusarium* head blight and seedling blight in wheat / W. Cheng, X. S. Song, H. P. Li, L. H. Cao, K. Sun, X. L. Qiu, Y. B. Xu, P. Yang, T. Huang, J. B. Zhang, B. Qu, Y. C. Liao // *Plant biotechnology journal*. – 2015. – V. 13. – №. 9. – P. 1335-1345.

51. Choi J. funRNA: a fungi-centered genomics platform for genes encoding key components of RNAi / J. Choi, K. T. Kim, J. Jeon, J. Wu, H. Song, F. O. Asiegbu, Y. H. Lee // *BMC genomics*. – 2014. – V. 15. – P. 1-10.

52. Coburn G. A., Cullen B. R. siRNAs: a new wave of RNA-based therapeutics / G. A. Coburn, B. R. Cullen // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2003. – V. 51. – №. 4. – P. 753-756.

53. Coursey T. Arabidopsis RNA polymerase V mediates enhanced compaction and silencing of geminivirus and transposon chromatin during host recovery from infection / T. Coursey, E. Regedanz, D. M. Bisaro // *Journal of Virology*. – 2018. – V. 92. – №. 7. – P. e01320-17.

54. Couzigou J. M. Positive gene regulation by a natural protective miRNA enables arbuscular mycorrhizal symbiosis / J. M. Couzigou, D. Laressergues, O. André, C. Gutjahr, B. Guillotin, G. Bécard, J. P. Combier // *Cell Host & Microbe*. – 2017. – V. 21. – №. 1. – P. 106-112.

55. Dalmay T. An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus / T. Dalmay, A. Hamilton, S. Rudd, S. Angell, D. C. Baulcombe // *Cell*. – 2000. – V. 101. – №. 5. – P. 543-553.

56. Dang Y. RNA interference in fungi: pathways, functions, and applications / Y. Dang, Q. Yang, Z. Xue, Y. Liu // *Eukaryotic cell*. – 2011. – V. 10. – №. 9. – P. 1148-1155.

57. de Alba A. E. M. Gene silencing in plants: a diversity of pathways / A. E. M. de Alba, E. Elvira-Matelot, H. Vaucheret // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. – 2013. – V. 1829. – №. 12. – P. 1300-1308.

58. De Palma M. Plant roots release small extracellular vesicles with antifungal activity / M. De Palma, A. Ambrosone, A. Leone, P. Del Gaudio, M. Ruocco, L. Turiák, R. Bokka, I. Fiume, M. Tucci, G. Pocsfalvi // *Plants*. – 2020. – V. 9. – №. 12. – P. 1777.

59. de Vries S. Evolutionarily dynamic, but robust, targeting of resistance genes by the miR482/2118 gene family in the *Solanaceae* / S. de Vries, T. Kloesges,

L. E. Rose // *Genome Biology and Evolution*. – 2015. – V. 7. – №. 12. – P. 3307-3321.

60. de Vries S. The elaboration of miRNA regulation and gene regulatory networks in plant–microbe interactions / S. de Vries, J. de Vries, L. E. Rose // *Genes*. – 2019. – V. 10. – №. 4. – P. 310.

61. Derbyshire M. Small RNAs from the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* highlight host candidate genes associated with quantitative disease resistance / M. Derbyshire, M. Mbengue, M. Barascud, O. Navaud, S. Raffaele // *Molecular Plant Pathology*. – 2019. – V. 20. – №. 9. – P. 1279-1297.

62. Diao P. miR403a and SA are involved in *NbAGO2* mediated antiviral defenses against TMV infection in *Nicotiana benthamiana* / P. Diao, Q. Zhang, H. Sun, W. Ma, A. Cao, R. Yu, J. Wang, Y. Niu, H. Wuriyangan // *Genes*. – 2019. – V. 10. – №. 7. – P. 526.

63. Ding F. A non-cationic nucleic acid nanogel for the delivery of the CRISPR/Cas9 gene editing tool / F. Ding, X. Huang, X. Gao, M. Xie, G. Pan, Q. Li, J. Song, X. Zhu, C. Zhang // *Nanoscale*. – 2019. – V. 11. – №. 37. – P. 17211-17215.

64. Downen R. H. Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress / R. H. Downen, M. Pelizzola, R. J. Schmitz, R. Lister, J. M. Downen, J. R. Nery, J. E. Dixon, J. R. Ecker // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – V. 109. – №. 32. – P. E2183-E2191.

65. Drinnenberg I. A. RNAi in budding yeast / I. A. Drinnenberg, D. E. Weinberg, K. T. Xie, J. P. Mower, K. H. Wolfe, G. R. Fink, D. P. Bartel // *Science*. – 2009. – V. 326. – №. 5952. – P. 544-550.

66. Dubey H. Identification and characterization of Dicer-like genes in leaf rust pathogen (*Puccinia triticina*) of wheat / H. Dubey, K. Kiran, R. Jaswal, S. C. Bhardwaj, T. K. Mondal, N. Jain, N. K. Singh, A. M. Kayastha, T. R. Sharma // *Functional & integrative genomics*. – 2020. – V. 20. – P. 711-721.

67. Dunker F. Oomycete small RNAs bind to the plant RNA-induced silencing complex for virulence / F. Dunker, A. Trutzenberg, J. S. Rothenpieler, S.

Kuhn, R. Pröls, T. Schreiber, A. Tissier, A. Kemen, E. Kemen, R. Hückelhoven, A. Weiberg // *Elife*. – 2020. – V. 9. – P. e56096.

68. Dutta S. Identification and molecular characterization of a trans-acting small interfering RNA producing locus regulating leaf rust responsive gene expression in wheat (*Triticum aestivum* L.) / S. Dutta, D. Kumar, S. Jha, K. V. Prabhu, M. Kumar, K. Mukhopadhyay // *Planta*. – 2017. – V. 246. – P. 939-957.

69. Etemadi M. Auxin perception is required for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis / M. Etemadi, C. Gutjahr, J. M. Couzigou, M. Zouine, D. Lauressergues, A. Timmers, C. Audran, M. Bouzayen, G. Bécard, J. P. Combier // *Plant Physiology*. – 2014. – V. 166. – №. 1. – P. 281-292.

70. Fang Y. Biogenesis and biological functions of extracellular vesicles in cellular and organismal communication with microbes / Y. Fang, Z. Wang, X. Liu, B. M. Tyler // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – V. 13. – P. 817844.

71. Feng H. Dicer-like genes are required for H₂O₂ and KCl stress responses, pathogenicity and small RNA generation in *Valsa mali* / H. Feng, M. Xu, Y. Liu, R. Dong, X. Gao, L. Huang // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – V. 8. – P. 1166.

72. Fire A. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // *Nature* 1998. V. 391, P. 806–811

73. Fukudome A. Specific requirement of DRB4, a dsRNA-binding protein, for the in vitro dsRNA-cleaving activity of Arabidopsis Dicer-like 4 / Fukudome, A., Kanaya, A., Egami, M., Nakazawa, Y., Hiraguri, A., Moriyama, H., & Fukuhara, T. // *Rna*. – 2011. – V. 17. – №. 4. – P. 750-760.

74. García-Gutiérrez L. The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF 6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate-and salicylic acid-dependent defence responses / L. García-Gutiérrez, H. Zerriouh, D. Romero, J. Cubero, A. de Vicente, A. Pérez-García // *Microbial Biotechnology*. – 2013. – V. 6. – №. 3. – P. 264-274.

75. Garcia-Ruiz H. Roles and programming of Arabidopsis ARGONAUTE proteins during Turnip mosaic virus infection / H. Garcia-Ruiz, A. Carbonell, J. S.

Hoyer, N. Fahlgren, K. B. Gilbert, A. Takeda, A. Giampetruzzi, M. T. Garcia Ruiz, M. G. McGinn, N. Lowery, M. T. Martinez Baladejo, J. C. Carrington // PLoS pathogens. – 2015. – V. 11. – №. 3. – P. e1004755.

76. Gebremichael D. E. RNA interference strategies for future management of plant pathogenic fungi: prospects and challenges / D. E. Gebremichael, Z. M. Haile, F. Negrini, S. Sabbadini, L. Capriotti, B. Mezzetti, E. Baraldi // Plants. – 2021. – V. 10. – №. 4. – P. 650.

77. Gimenez-Ibanez S. Nuclear jasmonate and salicylate signaling and crosstalk in defense against pathogens / S. Gimenez-Ibanez, R. Solano // Frontiers in plant science. – 2013. – V. 4. – P. 72.

78. Gu K. X. A β 2-tubulin dsRNA derived from *Fusarium asiaticum* confers plant resistance to multiple phytopathogens and reduces fungicide resistance / K. X. Gu, X. S. Song, X. M. Xiao, X. X. Duan, J. X. Wang, Y. B. Duan, Y. P. Hou, M. G. Zhou // Pesticide Biochemistry and Physiology. – 2019. – V. 153. – P. 36-46.

79. Guan R. Advances in the development of microbial double-stranded RNA production systems for application of RNA interference in agricultural pest control / R. Guan, D. Chu, X. Han, X. Miao, H. Li // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2021. – V. 9. – P. 753790.

80. Habig M. Ago1 affects the virulence of the fungal plant pathogen *Zymoseptoria tritici* / M. Habig, K. Schotanus, K. Hufnagel, P. Happel, E. H. Stukenbrock, // Genes. – 2021. – V. 12. – №. 7. – P. 1011.

81. Halim V. A. PAMP-induced defense responses in potato require both salicylic acid and jasmonic acid / V. A. Halim, S. Altmann, D. Ellinger, L. Eschen-Lippold, O. Miersch, D. Scheel, S. Rosahl // The Plant Journal. – 2009. – V. 57. – №. 2. – P. 230-242.

82. Hamada W. Co-suppression of the hydrophobin gene HCf-1 is correlated with antisense RNA biosynthesis in *Cladosporium fulvum* / W. Hamada, P. D. Spanu // Molecular and General Genetics MGG. – 1998. – V. 259. – №. 6. – P. 630-638.

83. Hasley J. A. R. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of sweet basil candidate susceptibility gene *ObDMR6* enhances downy mildew resistance / J. A. R. Hasley, N. Navet, M. Tian // PloS one. – 2021. – V. 16. – №. 6. – P. e0253245.
84. Hernández-Soto A. RNAi crop protection advances / A. Hernández-Soto, R. Chacón-Cerdas // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – V. 22. – №. 22. – P. 12148.
85. Hou Y. A Phytophthora effector suppresses trans-kingdom RNAi to promote disease susceptibility / Y. Hou, Y. I. Zhai, L. I. Feng, H. Z. Karimi, B. D. Rutter, L. Zeng, D. S. Choi, B. Zhang, W. Gu, X. Chen, W. Ye, R.W. Innes, J. Zhai, W. Ma // Cell host & microbe. – 2019. – V. 25. – №. 1. – P. 153-165.
86. Huang C. Small RNAs–big players in plant-microbe interactions / C. Y. Huang, H. Wang, P. Hu, R. Hamby, H. Jin // Cell host & microbe. – 2019. – V. 26. – №. 2. – P. 173-182.
87. Hunter L. J. R. Regulation of RNA-dependent RNA polymerase 1 and isochorismate synthase gene expression in *Arabidopsis* / L. J. Hunter, J. H. Westwood, G. Heath, K. Macaulay, A. G. Smith, S. A. MacFarlane, P. Palukaitis, J. P. Carr, // PLoS One. – 2013. – V. 8. – №. 6. – P. e66530.
88. Hunter L. J. R. RNA-dependent RNA polymerase 1 in potato (*Solanum tuberosum*) and its relationship to other plant RNA-dependent RNA polymerases / L. J. Hunter, S. F. Brockington, A. M. Murphy, A. E. Pate, K. Gruden, S. A. MacFarlane, P. Palukaitis, J. P. Carr // Scientific Reports. – 2016. – V. 6. – №. 1. – P. 1-11.
89. Hyakumachi M. *Bacillus thuringiensis* suppresses bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* with systemic induction of defense-related gene expression in tomato / M. Hyakumachi, M. Nishimura, T. Arakawa, S. Asano, S. Yoshida, S. Tsushima, H. Takahashi // Microbes and environments. – 2013. – V. 28. – №. 1. – P. 128-134.
90. Hyun Y. Cooperation and functional diversification of two closely related galactolipase genes for jasmonate biosynthesis / Y. Hyun, S. Choi, H. J. Hwang, J. Yu, S. J. Nam, J. Ko, J. Y. Park, Y. S. Seo, E. Y. Kim, S. B. Ryu, W. T.

Kim, Y. H. Lee, H. Kang, I. Lee // *Developmental cell*. – 2008. – V. 14. – №. 2. – P. 183-192.

91. Ismayil A. Cotton Leaf Curl Multan virus C4 protein suppresses both transcriptional and post-transcriptional gene silencing by interacting with SAM synthetase / A. Ismayil, Y. Haxim, Y. Wang, H. Li, L. Qian, T. Han, T. Chen, Q. Jia, A. Y. Liu, S. Zhu, H. Deng, R. Gorovits, Y. Hong, L. Hanley-Bowdoin, Y. Liu // *PLoS pathogens*. – 2018. – V. 14. – №. 8. – P. e1007282.

92. Ivanov K. I. Molecular insights into the function of the viral RNA silencing suppressor HCP ro / K. I. Ivanov, K. Eskelin, M. Bašić, S. De, A. Löhmus, M. Varjosalo, K. Mäkinen // *The Plant Journal*. – 2016. – V. 85. – №. 1. – P. 30-45.

93. Jahan S. N. Plant-mediated gene silencing restricts growth of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* / S. N. Jahan, A. K. Åsman, P. Corcoran, J. Fogelqvist, R. R. Vetukuri, C. Dixelius // *Journal of experimental botany*. – 2015. – V. 66. – №. 9. – P. 2785-2794.

94. Jeseničnik T. RNA interference core components identified and characterised in *Verticillium nonalfalfae*, a vascular wilt pathogenic plant fungi of hops / T. Jeseničnik, N. Štajner, S. Radišek, J. Jakše // *Scientific reports*. – 2019. – V. 9. – №. 1. – P. 8651.

95. Ji H. M. Fol-milR1, a pathogenicity factor of *Fusarium oxysporum*, confers tomato wilt disease resistance by impairing host immune responses / H.M. Ji, H.Y. Mao, S.J. Li, T. Feng, Z. Y. Zhang, L. Cheng, S.J. Luo, K.A. Borkovich, S.Q. Ouyang // *New Phytologist*. – 2021. – V. 232. – №. 2. – P. 705-718.

96. Jia H. Increased affinity for RNA targets evolved early in animal and plant Dicer lineages through different structural mechanisms / H. Jia, O. Kolaczowski, J. Rolland, B. Kolaczowski // *Molecular Biology and Evolution*. – 2017. – V. 34. – №. 12. – P. 3047-3063.

97. Jiang C. *Bacillus cereus* AR156 triggers induced systemic resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 by suppressing miR472 and activating CNLs-mediated basal immunity in *Arabidopsis* / C. Jiang, Z. Fan, Z. Li,

D. Niu, Y. Li, M. Zheng, Q. Wang, H. Jin, J. Guo // *Molecular plant pathology*. – 2020. – V. 21. – №. 6. – P. 854-870.

98. Jiang P. Reduction of *MLO1* expression in petunia increases resistance to powdery mildew / P. Jiang, Y. Chen, H. D. Wilde // *Scientia Horticulturae*. – 2016. – V. 201. – P. 225-229.

99. Jiang Y. X. The combination of *Bacillus thuringiensis* and its engineered strain expressing dsRNA increases the toxicity against *Plutella xylostella* / Y. X. Jiang, J. Z. Chen, M. W. Li, B. H. Zha, P. R. Huang, X. M. Chu, J. Chen, G. Yang // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – V. 23. – №. 1. – P. 444.

100. Jiao J., Peng D. Wheat microRNA1023 suppresses invasion of *Fusarium graminearum* via targeting and silencing FGSG_03101 / J. Jiao, D. Peng // *Journal of Plant Interactions*. – 2018. – V. 13. – №. 1. – P. 514-521.

101. Jo S. M. A putative RNA silencing component protein FoQde-2 is involved in virulence of the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* / S. M. Jo, Y. Ayukawa, S. H. Yun, K. Komatsu, T. Arie // *Journal of General Plant Pathology*. – 2018. – V. 84. – P. 395-398.

102. Johnson E. T. Reducing production of fumonisin mycotoxins in *Fusarium verticillioides* by RNA interference / E. T. Johnson, R. H. Proctor, C. A. Dunlap, M. Busman // *Mycotoxin research*. – 2018. – V. 34. – P. 29-37.

103. Kamthan A. Small RNAs in plants: recent development and application for crop improvement / A. Kamthan, A. Chaudhuri, M. Kamthan, A. Datta // *Frontiers in plant science*. – 2015. – V. 6. – P. 208.

104. Kang S. Fused: a promising molecular target for an RNAi-based strategy to manage Bt resistance in *Plutella xylostella* (L.) / S. Kang, D. Sun, J. Qin, L. Guo, L. Zhu, Y. Bai, Q. Wu, S. Wang, X. Zhou, Z. Guo, Y. Zhang // *Journal of Pest Science*. – 2021. – P. 1-14.

105. Kettles G. J. sRNA profiling combined with gene function analysis reveals a lack of evidence for cross-kingdom RNAi in the wheat–*Zymoseptoria tritici* pathosystem / G. J. Kettles, B. J. Hofinger, P. Hu, C. Bayon, J. J. Rudd, D.

Balmer, M. Courbot, K. E. Hammond-Kosack, G. Scalliet, K. Kanyuka // *Frontiers in plant science*. – 2019. – P. 892.

106. Koch A. Host-induced gene silencing—mechanisms and applications / A. Koch, M. Wassenegger // *New Phytologist*. – 2021. – V. 231. – №. 1. – P. 54-59.

107. Koornneef A. Cross talk in defense signaling / A. Koornneef, C. M. J. Pieterse // *Plant physiology*. – 2008. – V. 146. – №. 3. – P. 839-844.

108. Kouzai Y. CEBiP is the major chitin oligomer-binding protein in rice and plays a main role in the perception of chitin oligomers / Y. Kouzai, K. Nakajima, M. Hayafune, K. Ozawa, H. Kaku, N. Shibuya, E. Minami, Y. Nishizawa // *Plant molecular biology*. – 2014. – V. 84. – P. 519-528.

109. Krishnatreya D. B. Genome-wide identification, evolutionary relationship and expression analysis of *AGO*, *DCL* and *RDR* family genes in tea / D. B. Krishnatreya, P. M. Baruah, B. Dowarah, S. Chowrasia, T. K. Mondal, N. Agarwala // *Scientific Reports*. – 2021. – V. 11. – №. 1. – P. 8679.

110. Kunej U. Core RNA Interference Genes Involved in miRNA and Ta-siRNA Biogenesis in Hops and Their Expression Analysis after Challenging with *Verticillium nonalfalfae* / U. Kunej, J. Jakše, S. Radišek, N. Štajner // *International journal of molecular sciences*. – 2021. – V. 22. – №. 8. – P. 4224.

111. Lange M. Virus-induced gene silencing (VIGS) in plants: an overview of target species and the virus-derived vector systems / M. Lange, A. L. Yellina, S. Orashakova, A. Becker // *Virus-Induced Gene Silencing: Methods and Protocols*. – 2013. – P. 1-14.

112. Lax C. The evolutionary significance of RNAi in the fungal kingdom / C. Lax, G. Tahiri, J. A. Patiño-Medina, J. T. Cánovas-Márquez, J. A. Pérez-Ruiz, M. Osorio-Concepción, E. Navarro, S. Calo // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – V. 21. – №. 24. – P. 9348.

113. Lee W. S. Salicylic acid treatment and expression of an RNA-dependent RNA polymerase 1 transgene inhibit lethal symptoms and meristem invasion during tobacco mosaic virus infection in *Nicotiana benthamiana* / W. S. Lee, S. F. Fu, Z. Li, A. M. Murphy, E. A. Dobson, L. Garland, S. R. Chaluvadi, M.

G. Lewsey, R. S. Nelson, J. P. Carr // *BMC plant biology*. – 2016. – V. 16. – №. 1. – P. 1-14.

114. Leonetti P. Viral and subviral derived small RNAs as pathogenic determinants in plants and insects / P. Leonetti, P. Miesen, R. P. van Rij, V. Pantaleo // *Advances in Virus Research*. – 2020. – V. 107. – P. 1-36.

115. Lewsey M. G. Disruption of two defensive signaling pathways by a viral RNA silencing suppressor / M. G. Lewsey, A.M. Murphy, D. MacLean, N. Dalchau, J. H. Westwood, K. Macaulay, M. H. Bennett, M. Moulin, D. E. Hanke, G. Powell, A. G. Smith, J. P. Carr // *Molecular plant-microbe interactions*. – 2010. – V. 23. – №. 7. – P. 835-845.

116. Lewsey M. G. Mobile small RNAs regulate genome-wide DNA methylation / M. G. Lewsey, T. J. Hardcastle, C. W. Melnyk, A. Molnar, A. Valli, M. A. Urich, J. R. Nery, D. C. Baulcombe, J. R. Ecker // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2016. – V. 113. – №. 6. – P. E801-E810.

117. Liu B. Loss of function of *OsDCL1* affects microRNA accumulation and causes developmental defects in rice / B. Liu, P. Li, X. Li, C. Liu, S. Cao, C. Chu, X. Cao // *Plant physiology*. – 2005. – V. 139. – №. 1. – P. 296-305.

118. Liu G. Extracellular vesicles: Emerging players in plant defense against pathogens / G. Liu, G. Kang, S. Wang, Y. Huang, Q. Cai // *Frontiers in Plant Science*. – 2021. – V. 12. – P. 757925.

119. Liu Q. Dicer-like (DCL) proteins in plants / Q. Liu, Y. Feng, Z. Zhu // *Functional & integrative genomics*. – 2009. – V. 9. – P. 277-286.

120. Luan Y. Effective enhancement of resistance to *Phytophthora infestans* by overexpression of miR172a and b in *Solanum lycopersicum* / Y. Luan, J. Cui, J. Li, N. Jiang, P. Liu, J. Meng // *Planta*. – 2018. – V. 247. – P. 127-138.

121. Ma X. Different roles for RNA silencing and RNA processing components in virus recovery and virus-induced gene silencing in plants / X. Ma, M. C. Nicole, L. V. Meteignier, N. Hong, G. Wang, P. Moffett, // *Journal of experimental botany*. – 2015. – V. 66. – №. 3. – P. 919-932.

122. Ma X. Small RNA bidirectional crosstalk during the interaction between wheat and *Zymoseptoria tritici* / X. Ma, J. Wiedmer, J. Palma-Guerrero // *Frontiers in Plant Science*. – 2020. – V. 10. – P. 1669.
123. Maksimov I. Mechanisms of Plant Tolerance to RNA Viruses Induced by Plant-Growth- Promoting Microorganisms / I. V. Maksimov, A.V. Sorokan', G.F. Burkhanova, S.V. Veselova, V.Yu. Alekseev, M.Yu. Shein, R.M. Khairullin, // *Plants* 8:575, December 2019. – V. 8. – №. 12. – P. 575.
124. Maksimov I. V. Abscisic acid in the plants-pathogen interaction // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2009. – V. 56. – P. 742-752.
125. Maksimov I. V. The handbook of microbial bioresources / I. V. Maksimov, R. M. Khairullin // Ch. – 2016. – V. 4. – P. 56-80.
126. Mallory A. Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins / A. Mallory, H. Vaucheret // *The Plant Cell*. – 2010. – V. 22. – №. 12. – P. 3879-3889.
127. Mascia T. Tobacco mosaic virus infection triggers an RNAi-based response in *Phytophthora infestans* / T. Mascia, R. Labarile, F. Doohan, D. Gallitelli // *Scientific Reports*. – 2019. – V. 9. – №. 1. – P. 1-13.
128. Matsuo Y. Acibenzolar-S-methyl restricts infection of *Nicotiana benthamiana* by *Plantago asiatica* mosaic virus at two distinct stages / Y. Matsuo, F. Novianti, M. Takehara, T. Fukuhara, T. Arie, K. Komatsu // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2019. – V. 32. – №. 11. – P. 1475-1486.
129. Matzke M. A. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity / M. A. Matzke, R. A. Mosher // *Nature Reviews Genetics*. – 2014. – V. 15. – №. 6. – P. 394-408.
130. Matzke M. A. RNA-directed DNA methylation: the evolution of a complex epigenetic pathway in flowering plants / M. A. Matzke, T. Kanno, A. J. M. Matzke // *Annual review of plant biology*. – 2015. – V. 66. – P. 243-267.
131. McLoughlin A. G. Identification and application of exogenous dsRNA confers plant protection against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea* / A. G. McLoughlin, N. Wytinck, P. L. Walker, I. J. Girard, K. Y. Rashid, T. de Kievit, W.

G. Dilantha Fernando, S. Whyard, M. F. Belmonte // *Scientific Reports*. – 2018. – V. 8. – №. 1. – P. 1-14.

132. Mead O. Characterising the role of GABA and its metabolism in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum* / O. Mead, E. Thynne, B. Winterberg, P. S. Solomon, // *PLoS One*. – 2013. – V. 8. – №. 11. – P. e78368.

133. Melnyk C. W., Molnar A., Baulcombe D. C. Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals / C. W. Melnyk, A. Molnar, D. C. Baulcombe // *The EMBO journal*. – 2011. – V. 30. – №. 17. – P. 3553-3563.

134. Meng F. Cloning and characterization of two Argonaute genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) / F. Meng, H. Jia, N. Ling, Y. Xue, H. Liu, K. Wang, J. Yin, Y. Li // *BMC Plant Biology*. – 2013. – V. 13. – №. 1. – P. 1-10.

135. Meng H. Dicer and Argonaute genes involved in RNA interference in the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* / H. Meng, Z. Wang, Y. Wang, H. Zhu, B. Huang // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2017. – V. 83. – №. 7. – P. e03230-16.

136. Mitter N. Induction of virus resistance by exogenous application of double-stranded RNA / N. Mitter, E. A. Worrall, K. E. Robinson, Z. P. Xu, B. J. Carroll // *Current opinion in virology*. – 2017. – V. 26. – P. 49-55.

137. Mochama P. Mycoviruses as triggers and targets of RNA silencing in white mold fungus *Sclerotinia sclerotiorum* / P. Mochama, P. Jadhav, A. Neupane, S. Y. Lee Marzano // *Viruses*. – 2018. – V. 10. – №. 4. – P. 214.

138. Mu X. Y. MiR395 overexpression increases eggplant sensibility to *Verticillium dahliae* infection / X. Y. Mu, X. R. Liu, J. H. Cai, W. J. Zhu, Z. Wang, Q. Yang, X. You // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2018. – V. 65. – P. 203-210.

139. Muhammad T. RNA interference: a natural immune system of plants to counteract biotic stressors / T. Muhammad, F. Zhang, Y. Zhang, Y. Liang // *Cells*. – 2019. – V. 8. – №. 1. – P. 38.

140. Mukherjee K. Evolution of animal and plant dicers: early parallel duplications and recurrent adaptation of antiviral RNA binding in plants / K.

Mukherjee, H. Campos, B. Kolaczowski // *Molecular biology and evolution*. – 2013. – V. 30. – №. 3. – P. 627-641.

141. Mumbanza F. M. *In vitro* antifungal activity of synthetic dsRNA molecules against two pathogens of banana, *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense and *Mycosphaerella fijiensis* / F. M. Mumbanza, A. Kiggundu, G. Tusiime, W. K. Tushemereirwe, C. Niblett, A. Bailey // *Pest management science*. – 2013. – V. 69. – №. 10. – P. 1155-1162.

142. Natarajan B. MiRNA160 is associated with local defense and systemic acquired resistance against *Phytophthora infestans* infection in potato / B. Natarajan, H. S. Kalsi, P. Godbole, N. Malankar, A. Thiagarayaselvam, S. Siddappa // *Journal of experimental botany*. – 2018. – V. 69. – №. 8. – P. 2023-2036.

143. Nerva L. Double-stranded RNAs (dsRNAs) as a sustainable tool against gray mold (*Botrytis cinerea*) in grapevine: Effectiveness of different application methods in an open-air environment / L. Nerva, M. Sandrini, G. Gambino, W. Chitarra // *Biomolecules*. – 2020. – V. 10. – №. 2. – P. 200.

144. Neupane A. Roles of argonautes and dicers on *Sclerotinia sclerotiorum* antiviral RNA silencing / A. Neupane, C. Feng, P. K. Mochama, H. Saleem, S. Y. Lee Marzano // *Frontiers in plant science*. – 2019. – V. 10. – P. 976.

145. Nguyen Q. B. Systematic functional analysis of calcium-signalling proteins in the genome of the rice-blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, using a high-throughput RNA-silencing system / Q. B. Nguyen, N. Kadotani, S. Kasahara, Y. Tosa, S. Mayama, H. Nakayashiki // *Molecular microbiology*. – 2008. – V. 68. – №. 6. – P. 1348-1365.

146. Niehl A. Synthetic biology approach for plant protection using dsRNA / A. Niehl, M. Soininen, M. M. Poranen, M. Heinlein // *Plant biotechnology journal*. – 2018. – V. 16. – №. 9. – P. 1679-1687.

147. Nowara D. HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis* / D. Nowara, A. Gay, C. Lacomme, J. Shaw, C. Ridout, D. Douchkov, G. Hensel, J. Kumlehn, P. Schweizer // *The Plant Cell*. – 2010. – V. 22. – №. 9. – P. 3130-3141.

148. Nunes C. C. Host-induced gene silencing: a tool for understanding fungal host interaction and for developing novel disease control strategies / C. C. Nunes, R. A. Dean // *Molecular plant pathology*. – 2012. – V. 13. – №. 5. – P. 519-529.

149. Oliver R. P. *Stagonospora nodorum*: from pathology to genomics and host resistance / R. P. Oliver, T. L. Friesen, J. D. Faris, P. S. Solomon // *Annual review of phytopathology*. – 2012. – V. 50. – P. 23-43.

150. Omarov R. T. Biochemical mechanisms of suppression of RNA interference by plant viruses / R. T. Omarov, R. I. Bersimbai // *Biochemistry (Moscow)*. – 2010. – V. 75. – №. 8. – P. 965-970.

151. Panwar V. Host-induced gene silencing of wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* pathogenicity genes mediated by the Barley stripe mosaic virus / V. Panwar, B. McCallum, G. Bakkeren // *Plant molecular biology*. – 2013. – V. 81. – P. 595-608.

152. Panwar V. Host-induced silencing of essential genes in *Puccinia triticina* through transgenic expression of RNA i sequences reduces severity of leaf rust infection in wheat / V. Panwar, M. Jordan, B. McCallum, G. Bakkeren // *Plant biotechnology journal*. – 2018. – V. 16. – №. 5. – P. 1013-1023.

153. Pieterse C. M. J. Hormonal modulation of plant immunity / C. M. Pieterse, D. Van der Does, C. Zamioudis, A. Leon-Reyes, S. C. Van Wees // *Annual review of cell and developmental biology*. – 2012. – V. 28. – P. 489-521.

154. Pieterse C. M. J. Networking by small-molecule hormones in plant immunity / C. M. Pieterse, A. Leon-Reyes, S. Van der Ent, S. C. Van Wees // *Nature chemical biology*. – 2009. – V. 5. – №. 5. – P. 308-316.

155. Poveda, J. Activation of sweet pepper defense responses by novel and known biocontrol agents of the genus *Bacillus* against *Botrytis cinerea* and *Verticillium dahlia* / J. Poveda, J. Calvo, M. Barquero, F. González-Andrés // *European Journal of Plant Pathology*. – 2022. – V. 164. – №. 4. – P. 507-524.

156. Pradhan M. Argonaute4 modulates resistance to *Fusarium brachygibbosum* infection by regulating jasmonic acid signaling / M. Pradhan, P.

Pandey, I. T. Baldwin, S. P. Pandey // *Plant physiology*. – 2020. – V. 184. – №. 2. – P. 1128-1152.

157. Prakash V. Identification of transcription factor binding sites on promoter of RNA dependent RNA polymerases (RDRs) and interacting partners of RDR proteins through in silico analysis / V. Prakash, S. Chakraborty // *Physiology and Molecular Biology of Plants*. – 2019. – V. 25. – P. 1055-1071.

158. Qi S. Natural resources resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) in tomato (*Solanum lycopersicum*) / S. Qi, S. Zhang, M. M. Islam, A. H. El-Sappah, F. Zhang, Y. Liang // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – V. 22. – №. 20. – P. 10978.

159. Qi T. Host-induced gene silencing of an important pathogenicity factor *PsCPK1* in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* enhances resistance of wheat to stripe rust / T. Qi, X. Zhu, C. Tan, P. Liu, J. Guo, Z. Kang, J. Guo // *Plant biotechnology journal*. – 2018. – V. 16. – №. 3. – P. 797-807.

160. Qian X. Functional evolution in orthologous cell-encoded RNA-dependent RNA polymerases / X. Qian, F. M. Hamid, A. El Sahili, D. A. Darwis, Y. H. Wong, S., Bhushan, E. V. Makeyev, J. Lescar // *Journal of Biological Chemistry*. – 2016. – V. 291. – №. 17. – P. 9295-9309.

161. Qin L. *CaRDR1*, an RNA-dependent RNA polymerase plays a positive role in pepper resistance against TMV / L. Qin, N. Mo, Y. Zhang, T. Muhammad, G. Zhao, Y. Zhang, Y. Liang // *Frontiers in Plant Science*. – 2017. – V. 8. – P. 1068.

162. Rakhshandehroo F. Silencing the tobacco gene for RNA-dependent RNA polymerase 1 and infection by potato virus Y cause remodeling of cellular organelles / F. Rakhshandehroo, S. Rezaee, P. Palukaitis // *Virology*. – 2017. – V. 510. – P. 127-136.

163. Raman V. Small RNA functions are required for growth and development of *Magnaporthe oryzae* / V. Raman, S. A. Simon, F. Demirci, M. Nakano, B. C. Meyers, N. M. Donofrio // *Molecular plant-microbe interactions*. – 2017. – V. 30. – №. 7. – P. 517-530.

164. Riet J. *Bacillus subtilis* expressing double-strand RNAs (dsRNAs) induces RNA interference mechanism (RNAi) and increases survival of WSSV-challenged *Litopenaeus vannamei* / J. Riet, J. Costa-Filho, L. Dall'Agno, L. Medeiros, R. Azevedo, L. F. Nogueira, R. Maggioni, V. F. Pedrosa, L. A. Romano, J. Altenbuchner, W. Wasielesky Jr, L. F. Marins // *Aquaculture*. – 2021. – V. 541. – P. 736834.

165. Romano N. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences / N. Romano, G. Macino // *Molecular microbiology*. – 1992. – V. 6. – №. 22. – P. 3343-3353.

166. Rosahl, S. Oxylipins. / S. Rosahl, I. Feussner // *Plant lipids, biology, utilisation and Manipulation*. D. J. Murphy, ed. Blackwell Publisher, - Oxford. - 2004. - P. 329-354

167. Rutter B. D. Extracellular vesicles isolated from the leaf apoplast carry stress-response proteins / B. D. Rutter, R. W. Innes // *Plant physiology*. – 2017. – V. 173. – №. 1. – P. 728-741.

168. Salamon S. Expression patterns of mir398, mir167, and mir159 in the interaction between bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and pathogenic *Fusarium culmorum* and beneficial *Trichoderma* fungi / S. Salamon, J. Žok, K. Gromadzka, L. Błaszczyk // *Pathogens*. – 2021. – V. 10. – №. 11. – P. 1461.

169. Sang H. Advanced strategies to control plant pathogenic fungi by host-induced gene silencing (HIGS) and spray-induced gene silencing (SIGS) / H. Sang, J. I. Kim // *Plant Biotechnology Reports*. – 2020. – V. 14. – №. 1. – P. 1-8.

170. Schuurs T. Homology-dependent silencing of the SC3 gene in *Schizophyllum commune* / T. A. Schuurs, E. A. M. Schaeffer, J. G. H. Wessels // *Genetics*. – 1997. – V. 147. – №. 2. – P. 589-596.

171. Šečić E., Kogel K. H. Requirements for fungal uptake of dsRNA and gene silencing in RNAi-based crop protection strategies / E. Šečić, K. H. Kogel // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2021. – V. 70. – P. 136-142.

172. Shein M. The role of RNA interference in the formation of protective systems of wheat against the pathogen *Septoria Stagonospora nodorum* Berk / M.

Shein, I. Maksimov, G. Burkhanova // FEBS OPEN BIO. – 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY, 2021. – V. 11. – P. 123-123.

173. Shein M. Yu. The bacterial impact on the transcriptional activity of *DCL2* and *DCL4* genes in wheat plants infected with *Staganospora nodorum* / M. Yu. Shein, G. F. Burkhanova, I. V. Maksimov // The 6th international Scientific Conference “Plant genetics, genomics, bioinformatics and biotechnology” (PlantGene2021) Novosibirsk, 14-18 June 2021. – P. 201.

174. Shen D. Identification and characterization of micro RNAs in oilseed rape (*Brassica napus*) responsive to infection with the pathogenic fungus *Verticillium longisporum* using *Brassica AA* (*Brassica rapa*) and *CC* (*Brassica oleracea*) as reference genomes / D. Shen, I. Suhrkamp, Y. Wang, S. Liu, J. Menkhaus, J. A. Verreet, L. Fan, D. Cai, // New Phytologist. – 2014. – V. 204. – №. 3. – P. 577-594.

175. Shen W. The RNA-dependent RNA polymerase N1b of potyviruses plays multifunctional, contrasting roles during viral infection / W. Shen, Y. Shi, Z. Dai, A. Wang // Viruses. – 2020. – V. 12. – №. 1. – P. 77.

176. Silvestri A. *In silico* analysis of fungal small RNA accumulation reveals putative plant mRNA targets in the symbiosis between an arbuscular mycorrhizal fungus and its host plant / A. Silvestri, V. Fiorilli, L. Miozzi, G. P. Accotto, M. Turina, L. Lanfranco // BMC genomics. – 2019. – V. 20. – №. 1. – P. 1-18.

177. Song X. S. A myosin5 dsRNA that reduces the fungicide resistance and pathogenicity of *Fusarium asiaticum* / X. S. Song, K. X. Gu, X. X. Duan, X. M. Xiao, Y. P. Hou, Y. B. Duan, J. X. Wang, M. G. Zhou // Pesticide Biochemistry and Physiology. – 2018. – V. 150. – P. 1-9.

178. Song Y. Host-induced gene silencing compromises *Verticillium* wilt in tomato and *Arabidopsis* / Y. Song, B. P. H. J. Thomma // Molecular plant pathology. – 2018. – V. 19. – №. 1. – P. 77-89.

179. Terefe-Ayana D. Mining disease-resistance genes in roses: functional and molecular characterization of the *Rdr1* locus / D. Terefe-Ayana, A. Yasmin, T.

L. Le, H. Kaufmann, A. Biber, A. Kühr, M. Linde, T. Debener // *Frontiers in Plant Science*. – 2011. – V. 2. – P. 35.

180. Tetorya M. RNAi-mediated silencing of *PEX6* and *GAS1* genes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* confers resistance against *Fusarium* wilt in tomato / M. Tetorya, M. V. Rajam // *3 Biotech*. – 2021. – V. 11. – №. 10. – P. 443.

181. Tian Y. P. Genetic determinants of Potato virus Y required to overcome or trigger hypersensitive resistance to PVY strain group O controlled by the gene Ny in potato / Y. P. Tian, J. P. T. Valkonen // *Molecular plant-microbe interactions*. – 2013. – V. 26. – №. 3. – P. 297-305.

182. Tiwari I. M. Host delivered RNAi, an efficient approach to increase rice resistance to sheath blight pathogen (*Rhizoctonia solani*) / I. M. Tiwari, A. Jesuraj, R. Kamboj, B. N. Devanna, J. R. Botella, T. R. Sharma // *Scientific reports*. – 2017. – V. 7. – №. 1. – P. 7521.

183. Van der Does D. Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCFCO11-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59 / D. Van der Does, A. Leon-Reyes, A. Koornneef, M. C. Van Verk, N. Rodenburg, L. Pauwels, A. Goossens, A. P. Körbes, J. Memelink, T. Ritsema, S. C. Van Wees, C. M. Pieterse // *The Plant Cell*. – 2013. – V. 25. – №. 2. – P. 744-761.

184. van Loon L. C. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants / L. C. van Loon, M. Rep, C. M. J. Pieterse // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2006. – V. 44. – P. 135-162.

185. Várallyay É. Virus-induced gene silencing of Mlo genes induces powdery mildew resistance in *Triticum aestivum* / É. Várallyay, G. Giczey, J. Burgyán // *Archives of virology*. – 2012. – V. 157. – P. 1345-1350.

186. Vega-Arreguín J. C. Recognition of an Avr3a homologue plays a major role in mediating nonhost resistance to *Phytophthora capsici* in *Nicotiana* species / J. C. Vega-Arreguín, A. Jalloh, J. I. Bos, P. Moffett // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2014. – V. 27. – №. 8. – P. 770-780.

187. Veselova S. V. Ethylene-Cytokinin Interaction Determines Early Defense Response of Wheat against *Stagonospora nodorum* Berk / S. V. Veselova, T. V. Nuzhnaya, G. F. Burkhanova, S. D. Romyantsev, E. K. Khusnutdinova, I. V. Maksimov // *Biomolecules*. – 2021. – V. 11. – №. 2. – P. 174.

188. Villalobos-Escobedo J. M. The interaction of fungi with the environment orchestrated by RNAi / J. M. Villalobos-Escobedo, A. Herrera-Estrella, N. Carreras-Villaseñor // *Mycologia*. – 2016. – V. 108. – №. 3. – P. 556-571.

189. Waewthongrak W. Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* ABS-S14 elicit defense-related gene expression in citrus fruit / W. Waewthongrak, W. Leelasuphakul, G. McCollum // *PloS one*. – 2014. – V. 9. – №. 10. – P. e109386.

190. Wang B. *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* mi croRNA-like RNA 1 (Pst-milR1), an important pathogenicity factor of Pst, impairs wheat resistance to Pst by suppressing the wheat pathogenesis-related 2 gene / B. Wang, Y. Sun, N. Song, M. Zhao, R. Liu, H. Feng, X. Wang, Z. Kang // *New Phytologist*. – 2017. – V. 215. – №. 1. – P. 338-350.

191. Wang J. *Aegilops tauschii* single nucleotide polymorphisms shed light on the origins of wheat D-genome genetic diversity and pinpoint the geographic origin of hexaploid wheat / J. Wang, M. C. Luo, Z. Chen, F. M. You, Y. Wei, Y. Zheng, J. Dvorak // *New phytologist*. – 2013. – V. 198. – №. 3. – P. 925-937.

192. Wang J. Plant microRNAs: Biogenesis, Homeostasis, and Degradation. / J. Wang, J. Mei, G. Ren // *Front Plant Sci*. - 2019. - V.10. - art. 360.

193. Wang M. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection / M. Wang, A. Weiberg, F. M. Lin, B. P. Thomma, H. D. Huang, H. Jin // *Nature plants*. – 2016. – V. 2. – №. 10. – P. 1-10.

194. Wang M. Movement of small RNAs in and between plants and fungi / M. Wang, R. A. Dean // *Molecular Plant Pathology*. – 2020. – V. 21. – №. 4. – P. 589-601.

195. Wang Q. Dicer-like proteins regulate the growth, conidiation, and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Hevea brasiliensis* / Q. Wang,

B. An, X. Hou, Y. Guo, H. Luo, C. He // *Frontiers in microbiology*. – 2018. – V. 8. – P. 2621.

196. Wang Y. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew / Y. Wang, X. Cheng, Q. Shan, Y. Zhang, J. Liu, C. Gao, J. L. Qiu // *Nature biotechnology*. – 2014. – V. 32. – №. 9. – P. 947-951.

197. Weiberg A. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways / A. Weiberg, M. Wang, F. M. Lin, H. Zhao, Z. Zhang, I. Kaloshian, H. Jin // *Science*. – 2013. – V. 342. – №. 6154. – P. 118-123.

198. Werner B. T. *Fusarium graminearum* DICER-like-dependent sRNAs are required for the suppression of host immune genes and full virulence / B. T. Werner, A. Koch, E. Šečić, J. Engelhardt, L. Jelonek, J. Steinbrenner, K. H. Kogel // *Plos one*. – 2021. – V. 16. – №. 8. – P. e0252365.

199. Werner B. T. RNA-spray-mediated silencing of *Fusarium graminearum* *AGO* and *DCL* genes improve barley disease resistance / B. T. Werner, F. Y. Gaffar, J. Schuemann, D. Biedenkopf, A. M. Koch // *Frontiers in Plant Science*. – 2020. – V. 11. – P. 476.

200. Westwood J. H. A viral RNA silencing suppressor interferes with abscisic acid-mediated signalling and induces drought tolerance in *Arabidopsis thaliana* / J. H. Westwood, L. Mccann, M. Naish, H. Dixon, A. M. Murphy, M. A. Stancombe, J. P. Carr // *Molecular plant pathology*. – 2013. – V. 14. – №. 2. – P. 158-170.

201. Wong-Bajracharya J. The ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* encodes a microRNA involved in cross-kingdom gene silencing during symbiosis / J. Wong-Bajracharya, V. R. Singan, R. Monti, K. L. Plett, V. Ng, I. V. Grigoriev, F. M. Martin, I. C. Anderson, J. M. Plett // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2022. – V. 119. – №. 3. – P. e2103527119.

202. Worrall E. A. Exogenous application of RNAi-inducing double-stranded RNA inhibits aphid-mediated transmission of a plant virus / E. A. Worrall,

A. Bravo-Cazar, A. T. Nilon, S. J. Fletcher, K. E. Robinson, J. P. Carr, N. Mitter // *Frontiers in plant science*. – 2019. – V. 10. – P. 265.

203. Wu F. Mediator subunit MED25 couples alternative splicing of JAZ genes with fine-tuning of jasmonate signaling / F. Wu, L. Deng, Q. Zhai, J. Zhao, Q. Chen, C. Li // *The Plant Cell*. – 2020. – V. 32. – №. 2. – P. 429-448.

204. Wu P. Identification of arbuscular mycorrhiza (AM)-responsive microRNAs in tomato / P. Wu, Y. Wu, C. C. Liu, L. W. Liu, F. F. Ma, X. Y. Wu, Y. Y. Hang, J. Q. Chen, Z. Q. Shao, B. Wang // *Frontiers in plant Science*. – 2016. – V. 7. – P. 429.

205. Wytinck N. dsRNA uptake in plant pests and pathogens: insights into RNAi-based insect and fungal control technology / N. Wytinck, C.L. Manchur, V.H. Li, S. Whyard, M.F. Belmonte // *Plants*. – 2020. – V. 9. – №. 12. – P. 1780.

206. Xie Z. DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* / Z. Xie, E. Allen, A. Wilken, J. C. Carrington // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2005. – V. 102. – №. 36. – P. 12984-12989.

207. Xin M. Diverse set of microRNAs are responsive to powdery mildew infection and heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) / M. Xin, Y. Wang, Y. Yao, C. Xie, H. Peng, Z. Ni, Q. Sun // *BMC plant biology*. – 2010. – V. 10. – №. 1. – P. 1-11.

208. Xiong Q. Phytophthora suppressor of RNA silencing 2 is a conserved RxLR effector that promotes infection in soybean and *Arabidopsis thaliana* / Q. Xiong, W. Ye, D. Choi, J. Wong, Y. Qiao, K. Tao // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2014. – V. 27. – №. 12. – P. 1379-1389.

209. Yadav V. RNAi is a critical determinant of centromere evolution in closely related fungi / V. Yadav, S. Sun, R. B. Billmyre, B. C. Thimmappa, T. Shea, R. Lintner, G. Bakkeren, C. A. Cuomo, J. Heitman, K. Sanyal // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2018. – V. 115. – №. 12. – P. 3108-3113.

210. Yang L. Identification of MiRNA from eggplant (*Solanum melongena* L.) by small RNA deep sequencing and their response to *Verticillium dahliae*

infection / L. Yang, D. Jue, W. Li, R. Zhang, M. Chen, Q. Yang // PloS one. – 2013. – V. 8. – №. 8. – P. e72840.

211. Yang L. Overexpression of potato miR482e enhanced plant sensitivity to *Verticillium dahliae* infection / L. Yang, X. Mu, C. Liu, J. Cai, K. Shi, W. Zhu, Q. Yang // Journal of integrative plant biology. – 2015. – V. 57. – №. 12. – P. 1078-1088.

212. Yang Y. The integrative expression and co-expression analysis of the *AGO* gene family in rice / Y. Yang, J. Zhong, Y. D. Ouyang, J. Yao // Gene. – 2013. – V. 528. – №. 2. – P. 221-235.

213. Yara A. Disease resistance against *Magnaporthe grisea* is enhanced in transgenic rice with suppression of ω -3 fatty acid desaturases / A. Yara, T. Yaeno, M. Hasegawa, H. Seto, J. L. Montillet, K. Kusumi, S. Seo, K. Iba // Plant and cell physiology. – 2007. – V. 48. – №. 9. – P. 1263-1274.

214. Ye W. Colonisation of *Oncidium* orchid roots by the endophyte *Piriformospora indica* restricts *Erwinia chrysanthemi* infection, stimulates accumulation of NBS-LRR resistance gene transcripts and represses their targeting micro-RNAs in leaves / W. Ye, J. Jiang, Y. Lin, K. W. Yeh, Z. Lai, X. Xu, R. Oelmüller // BMC plant biology. – 2019. – V. 19. – P. 1-16.

215. Yin C. Silencing dicer-like genes reduces virulence and sRNA generation in *Penicillium italicum*, the cause of citrus blue mold / C. Yin, H. Zhu, Y. Jiang, Y. Shan, L. Gong // Cells. – 2020. – V. 9. – №. 2. – P. 363.

216. Yu X. *Malus hupehensis* miR168 targets to ARGONAUTE1 and contributes to the resistance against *Botryosphaeria dothidea* infection by altering defense responses / X. Yu, Y. Hou, W. Chen, S. Wang, P. Wang, S. Qu // Plant and Cell Physiology. – 2017. – V. 58. – №. 9. – P. 1541-1557.

217. Zhang B.S. *Verticillium dahliae* Secretes Small RNA to Target Host MIR157d and Retard Plant Floral Transition During Infection / B. S. Zhang, Y. C. Li, H. S. Guo, J. H. Zhao // Frontiers in Plant Science. – 2022. – V. 13.

218. Zhang H. Expression of tomato prosystemin gene in *Arabidopsis* reveals systemic translocation of its mRNA and confers necrotrophic fungal

resistance / H. Zhang, P. Yu, J. Zhao, H. Jiang, H. Wang, Y. Zhu, M. A. Botella, J. Šamaj, C. Li, J. Lin // *New phytologist*. – 2018. – V. 217. – №. 2. – P. 799-812.

219. Zhang H. Long non-coding genes implicated in response to stripe rust pathogen stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) / H. Zhang, X. Chen, C. Wang, Z. Xu, Y. Wang, X. Liu, Z. Kang, W. Ji // *Molecular biology reports*. – 2013. – V. 40. – P. 6245-6253.

220. Zhang H. Transposon-derived small RNA is responsible for modified function of WRKY45 locus / H. Zhang, Z. Tao, H. Hong, Z. Chen, C. Wu, X. Li, J. Xiao, S. Wang // *Nature Plants*. – 2016. – V. 2. – №. 3. – P. 1-8.

221. Zhang J. Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids / J. Zhang, S. A. Khan, C. Hasse, S. Ruf, D. G. Heckel, R. Bock // *Science*. – 2015. – V. 347. – №. 6225. – P. 991-994.

222. Zhang T. Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen / T. Zhang, Y. L. Zhao, J. H. Zhao, S. Wang, Y. Jin, Z. Q. Chen, Y. Y. Fang, C. L. Hua, S. W. Ding, H. S. Guo // *Nature plants*. – 2016. – V. 2. – №. 10. – P. 1-6.

223. Zhang T. Exploring the Effectiveness and Durability of Trans-Kingdom Silencing of Fungal Genes in the Vascular Pathogen *Verticillium dahlia* / T. Zhang, J. H. Zhao, Y. Y. Fang, H. S. Guo, Y. Jin // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – V. 23. – №. 5. – P. 2742.

224. Zhang X. *Arabidopsis* Argonaute 2 regulates innate immunity via miRNA393*-mediated silencing of a Golgi-localized SNARE gene, MEMB12 / X. Zhang, H. Zhao, S. Gao, W. Wang, S. Katiyar-Agarwal, H. Huang, N. Raikhel, H. Jin // *Molecular cell*. – 2011. – V. 42. – №. 3. – P. 356-366.