

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук
(УФИЦ РАН)**

**Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
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**

1.5.21. Физиология и биохимия растений

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

Уфа–2022

Работа выполнена в Уфимском Институте биохимии и генетики – обособленном структурном подразделении Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

Научный руководитель: - **Максимов Игорь Владимирович**, профессор, доктор биологических наук, заведующий лабораторией биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН

Рецензенты - **Федяев Вадим Валентинович**, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии и биотехнологии БашГУ.

- **Баймиев Андрей Ханифович**, доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. 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 в этих условиях является создание новых иммунных сортов и стимулирование естественных фитозащитных механизмов с помощью экзогенных регуляторов и эндофитных микроорганизмов. Защитный механизм РНК-интерференции - это 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. Основными действующими «лицами» РНК интерференции являются малые (короткие) регуляторные РНК, формирующиеся из длинных, двухцепочечных РНК (дцРНК) и образующие комплекс с белками Dicer (в растениях Dicer подобные белки (Dicer Like, DCL) разрезающие целевые РНК на малые фрагменты и белки Argonaute (Ago) взаимодействующие с последними и формирующие комплекс, комплементарный целевым РНК. 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. 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]. Важно также заметить, более высокую активность генов, кодирующих ответственные за РНК-интерференцию 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 транскрипционной активности этих генов [Cao et al., 2016]. Обнаружена способность ряда малых РНК гриба *Botrytis cinerea* (Bc-sRNAs) подавлять экспрессию ряда 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]. Важность белков AGO1 в формировании совместимых отношений подтверждается, кроме того, и тем, что подавление их синтеза повышала устойчивость к грибам *Verticillium dahlia* и *Verticillium longisporum* [Ellendorff et al., 2009; Shen et al., 2014]. Однако, о работе системы РНК-интерференции в растениях, инфицированных фитопатогенами, и в особенности грибов-гемибиотрофов, к числу которых относится гриб *Stagonospora nodorum* Berk - ничего не известно.

Цель исследования – оценка роли генов, кодирующих белки AGO и DCL, компонентов РНК-интерференции, в формировании патогенной системы контрастных по устойчивости сортов мягкой пшеницы *Triticum aestivum* с возбудителем септориоза *Stagonospora nodorum* Berk. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить роль пшеничных генов *TaAGO* и *TaDCL* системы РНКи в формировании защитного ответа растения в условиях инфицирования патогеном;
2. Изучить влияние грибных генов *SnAGO* и *SnDCL* системы РНКи в условиях инфицирования патогеном контрастных по устойчивости сортов пшеницы;
3. Оценить влияние предобработки семян салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислот на активность генов системы РНКи в ходе развития болезни;
4. Оценить влияние предобработки семян бактериальным штаммом *B. subtilis* 26Д на активность генов системы РНКи в ходе развития болезни.

Научная новизна исследования. Показано возможность диагностики устойчивости растений пшеницы к патогену с использованием соотношения генов домашнего хозяйства партнеров патогенной системы. Впервые установлено влияние инфицирования растения пшеницы возбудителем септориоза *S. nodorum* Berk на транскрипционную активность растительных и грибных генов AGO и DCL системы РНК-интерференции. Выявлена корреляция между транскрипционной активностью генов AGO и DCL пшеницы и патогена и обработкой семян растворами СК и ЖК, а также бактериальными штаммом *B. subtilis* 26Д.

Научно-практическая значимость исследования. Полученные данные позволяют расширить представления о физиологических и биохимических механизмах устойчивости растений. Возможность индуцирования/супрессии экспрессии генов, ответственных за кодирование белков РНК-интерференции растения (пшеницы) или патогена (септории) за счет обработки растений двуцепочечными РНК и эндофитными штаммами *B. subtilis* может быть использовано при создании биопрепаратов против возбудителя септориоза. 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.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Гены семейств *AGO* и *DCL* принимают активное участие в формировании защитной системы растения при его поражении патогенным грибом *S. nodorum* Berk

2. Системы РНКи у растения-хозяина и патогенного гриба находятся во взаимосвязи в условиях инфицирования.

3. Бактерии штамма *B. subtilis* 26Д индуцируют транскрипционную активность генов РНКи пшеницы.

4. Предобработка семян салициловой и жасмоновой кислотами стимулирует выработку продуктов генов РНКи у растения пшеницы.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на IX Съезде общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего» (Казань, 18–24 сентября 2019 г.); 45-й виртуальной (онлайн) конференции FEBS (Словения, Любляна, 3-8 июля 2021 г.), на 6-й международной научной конференции «генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений» PlantGen2021 (14-18 июня 2021, г. Новосибирск); на VII всероссийской научно-практической конференции «Биологические и технологические основы селекции, семеноводства, размножения и защиты сельскохозяйственных и лесных древесных растений» (Ялта, 6 – 11 сентября 2021 г.); на конференции с международным участием «ЭКОБИОТЕХ–2021» (Уфа, 4-7 октября 2021 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 печатные работы из списка ВАК, две из которых относятся к индексируемым в базе данных Web of science. Кроме того, на данный момент имеются 3 статьи на рассмотрении в редакции.

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

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из Введения, 3 глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 100 страницах, содержит 7 таблиц и 11 рисунков. Список литературы включает 155 источник, из них 153 иностранных.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, д.б.н. Максиму И.В. за ценные советы и всестороннюю поддержку на всех этапах выполнения работы, всем сотрудникам лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН за помощь в проведении лабораторных исследований и обсуждении работы.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В данном разделе приводятся данные литературы о ризобактериях, стимулирующих рост растений и функция продуцируемых бактериями гормонов (ауксинов, цитокининов, абсцизовой кислоты (АБК), этилена, гиббереллинов,

жасмоновой и салициловой кислоты), механизмах влияния ризосферных бактерий на содержание гормонов в растениях и взаимодействии гормонов друг с другом, о засолении и механизмах солеустойчивости (осмотическом и токсическом компонентах в действии засоления и роли апопластных барьеров в солеустойчивости растений).

2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объекты исследования. Эксперименты проводились на растениях пшеницы (*Triticum aestivum* L.) двух контрастных по устойчивости к возбудителю септориоза грибу *Stagonospora nodorum* Berk сортов: Жница (восприимчивый) и Омская 35 (Ом35) (устойчивый). В экспериментах использовали штамм *B. subtilis* 26Д, выделенный из коммерческого биопрепарата Фитоспорин–М (Башинком, Россия), выращенные в чашках Петри на питательном картофельно-глюкозном агаре.

Постановка экспериментов. Опыт проводился 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) при комнатной температуре (20-22°С). Семена стерилизовали 80%-м р-ром этанола (1 мин) и несколько раз промывались стерильной водой. Часть семян подвергали предпосевной обработке СК и ЖК в концентрации 50 мкМ [Нужная и др., 2017]. Экспериментальные и контрольные Семена проращивались в эмалированных кюветах на влажной фильтровальной бумаге. Посуду и бумагу автоклавировали при температуре 150-180°С в течение 1,5-2 часов (Полевой, Чиркова, 2001). Полностью развернутые первые листья 7-суточных проростков срезали и помещали в чашки Петри на влажную вату с добавлением бензимидазола (40 мг/л). Производили предварительное предпосевное замачивание семян водными растворами СК, ЖК, а также бактериальной суспензией штамма *B. subtilis* 26Д. Конечные концентрации растворов, использованные в большинстве экспериментов (СК 10^{-3} М и ЖК - 10^{-3} М, а также суспензия бактерий *Bacillus* ssp. - 10^8 кл. /мл) были подобраны после предварительного анализа их концентрационных составляющих на проростках пшеницы (глава. 3.1.1).

Инфицирование растений. Инфицирование проростков грибом *S. nodorum* проводили путем нанесения на лист микропипеткой суспензии спор в концентрации 10⁵ спор/мл одной микрокаплей объемом 4-5 мкл на лист (Максимов и др., 2013). Инокулированные патогеном листья выдерживали при комнатных условиях в темноте в течение 24 часов, после чего переносили на светоплощадку с фотопериодом 16 ч/сут.

Визуальная оценка степени поражения. Наблюдение за развитием патогенного гриба *Stagonospora nodorum* Berk в лабораторных условиях проводилось ежедневно. Степень поражения и проявления симптомов у растения оценивалась по 4-бальной системе, разработанной во Всероссийском НИИ фитопатологии [Пыжиков, Карасена, 1986]. На отрезках листьев симптомы болезни проявлялись на 4-5 сутки после инфицирования в виде пятен эллиптической формы от светло-коричневого до бурого цвета, окруженных желтым некрозом. Образование пикнид наблюдалось на 7-20

день после инокуляции. Граница бурого пятна на восприимчивых сортах проявлялась не четко, а некротическая зона постепенно переходила от желтого к зеленому, что соответствовало 4 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 проводилось согласно методике, предложенной Марченковой с соавторами (Марченкова и др., 1991). Площадь зоны поражения на отрезках листьев измеряли с помощью программы ImageJ ([rsb web.nih.gov/ij/download.html](http://rsb.web.nih.gov/ij/download.html)).

Биоинформационные методы. Проведен биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей с использованием известных генетических баз данных, например, NCBI и, на основе полученных данных, подобраны праймеры для работ по анализу транскрипционной активности генов *DCL* и *AGO* мягкой пшеницы в норме и в условиях инфицирования растений фитопатогенным грибом *Stagonospora nodorum*. В базе генетических данных GENBank NCBI на момент анализа 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 subsp*) (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 эгилопса тауша (*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 модельных объектов (*Oryza sativa Japonica*, *Zea mays*).

Подбор олигонуклеотидных последовательностей. Праймеры к генам системы РНКи пшеницы были подобраны с использованием базы данных «NCBI» (Таблица 1). Праймеры к генам РНКи возбудителя септориоза были подобраны с использованием базы данных «FunRNA» (Таблица 2). Для подбора праймеров использовались открытые интернет-ресурсы «Primer-Blast» (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) и «PrimerQuest Tool» (<https://eu.idtdna.com/Primerquest>).

Молекулярно-биологические методы. ДНК из листьев растений выделяли фенольно-детергентным методом [Маниатис, 1984]. Выделение

общей РНК проводили с использованием тризола (“Molecular Research Center, Inc.”, США), согласно протоколу фирмы-поставщика. Для синтеза кДНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием M-MuLV обратной транскриптазы (“Синтол”, Россия). Анализ экспрессии исследуемых генов системы РНКи у растения и патогена проводили 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). Измерения проводили в 3-х биологических и 3-х аналитических повторностях.

Статистическая обработка результатов. Измерения проводили в 3-х биологических и 3-х аналитических повторностях. Статистическую обработку данных ПЦР в реальном времени производили с использованием программы Microsoft Excel и Statistica (StatSoft, Россия). Данные электрофореза обрабатывали с помощью программы TotalLab v2.01 (Newcastle-Upon-Tyne, UK). Симптомы развития септориоза оценивали по 4-х бальной системе. Площадь зоны поражения на отрезках листьев измеряли с помощью компьютерной программы ImageJ (rsbweb.nih.gov/ij/download.html).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

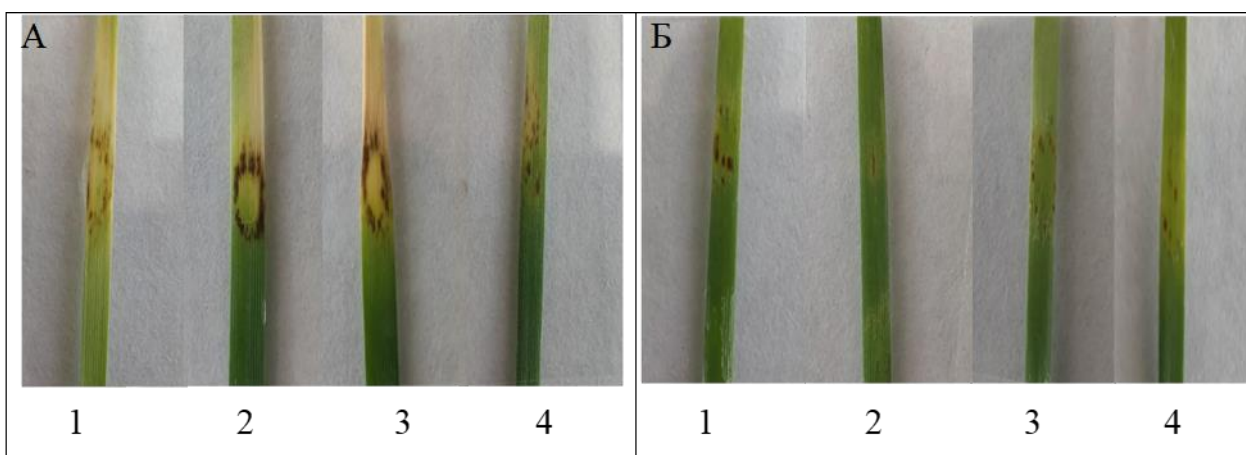


Рисунок 1. Степень поражения листьев восприимчивого (А) и устойчивого (Б) сортов пшеницы грибом *S. nodorum* (1) и после предварительной обработки СК (2), ЖК (3) и СК+ЖК (4) через 7 дней после инфицирования

Интенсивность формирования инфекционного пятна и быстрое развитие некрозов в листьях восприимчивого сорта Жница гриб говорит о его высокой степени поражаемости патогеном (Рис. 1).

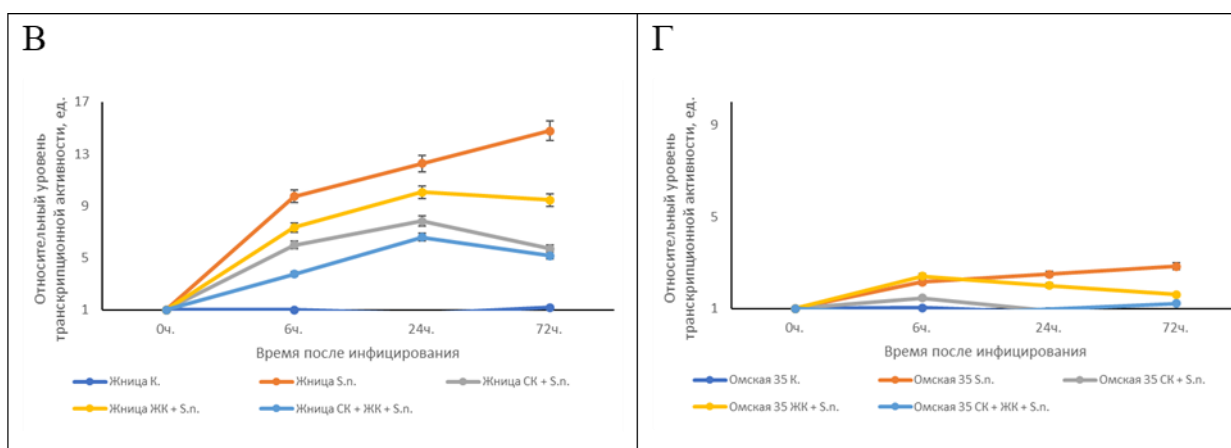
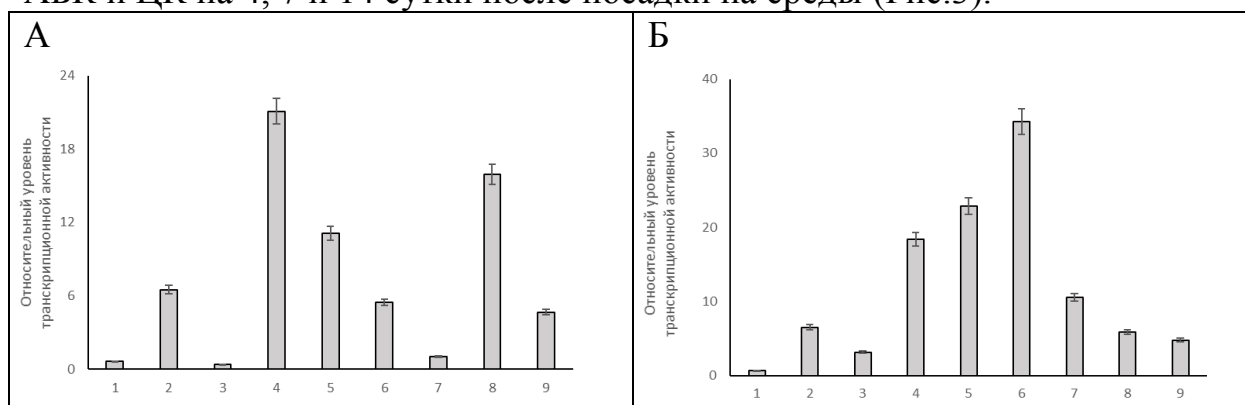


Рисунок 2. Активность грибного референсного гена *SnTUB* после инфицирования и обработки листьев СК, ЖК, СК + ЖК у восприимчивого (В) и устойчивого (Г) сортов мягкой пшеницы по отношению к пшеничному референсному гену *TaRLI* во времени

В то же время на устойчивом сорте Омская 35 болезнь развивалась менее интенсивно. Основываясь на этом, мы провели анализ соотношения уровня референсных генов хозяина *TaRLI* и грибного патогена *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. 2). Как видно из полученных данных, соотношение ДНК грибных генов *SnTUB* к растительным *TaRLI* у восприимчивого сорта Жница в течение наблюдаемого периода было намного выше, чем у устойчивого.

3.2. Транскрипционная активность генов системы РНКи у патогенного гриба *S. nodorum* в условиях выращивания на питательной среде

Была проведена оценка транскрипционной активности локусов генов системы РНКи у двух штаммов гриба *S. nodorum* (1SP и 4ВД) при обработке АБК и ЦК на 4, 7 и 14 сутки после посадки на среды (Рис.3).



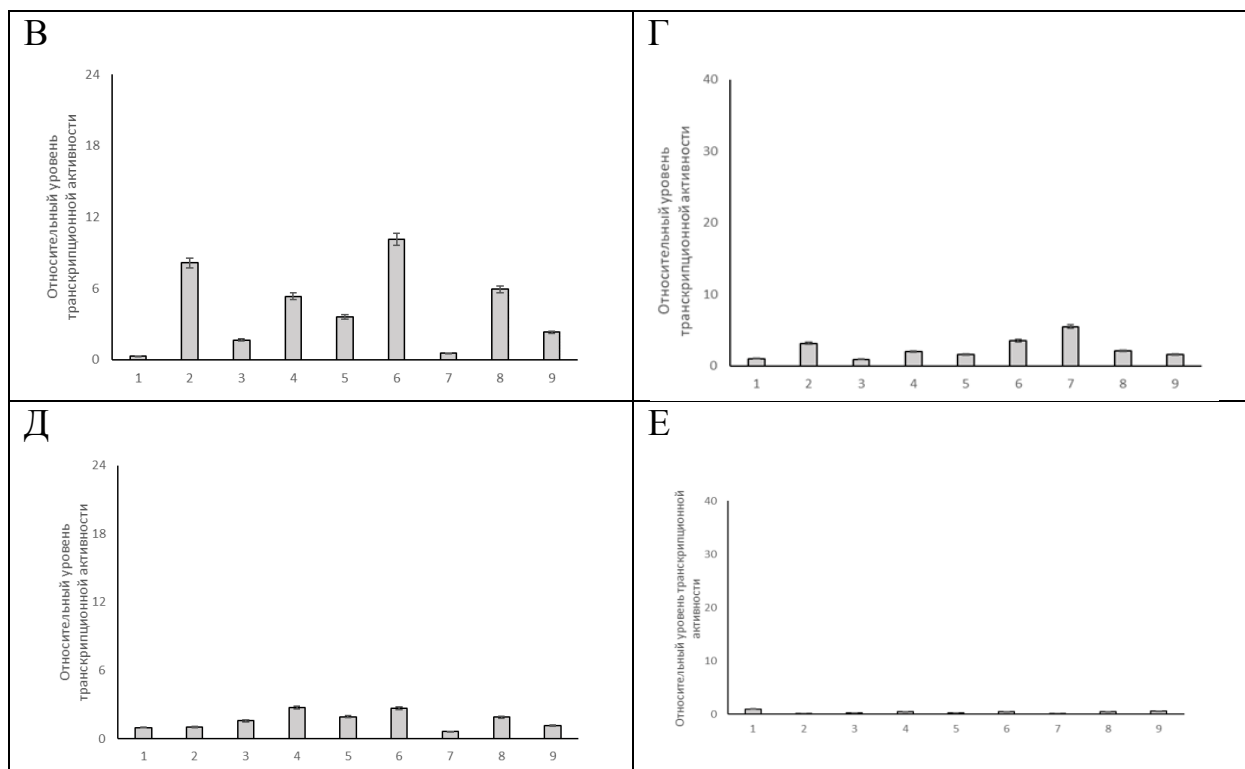
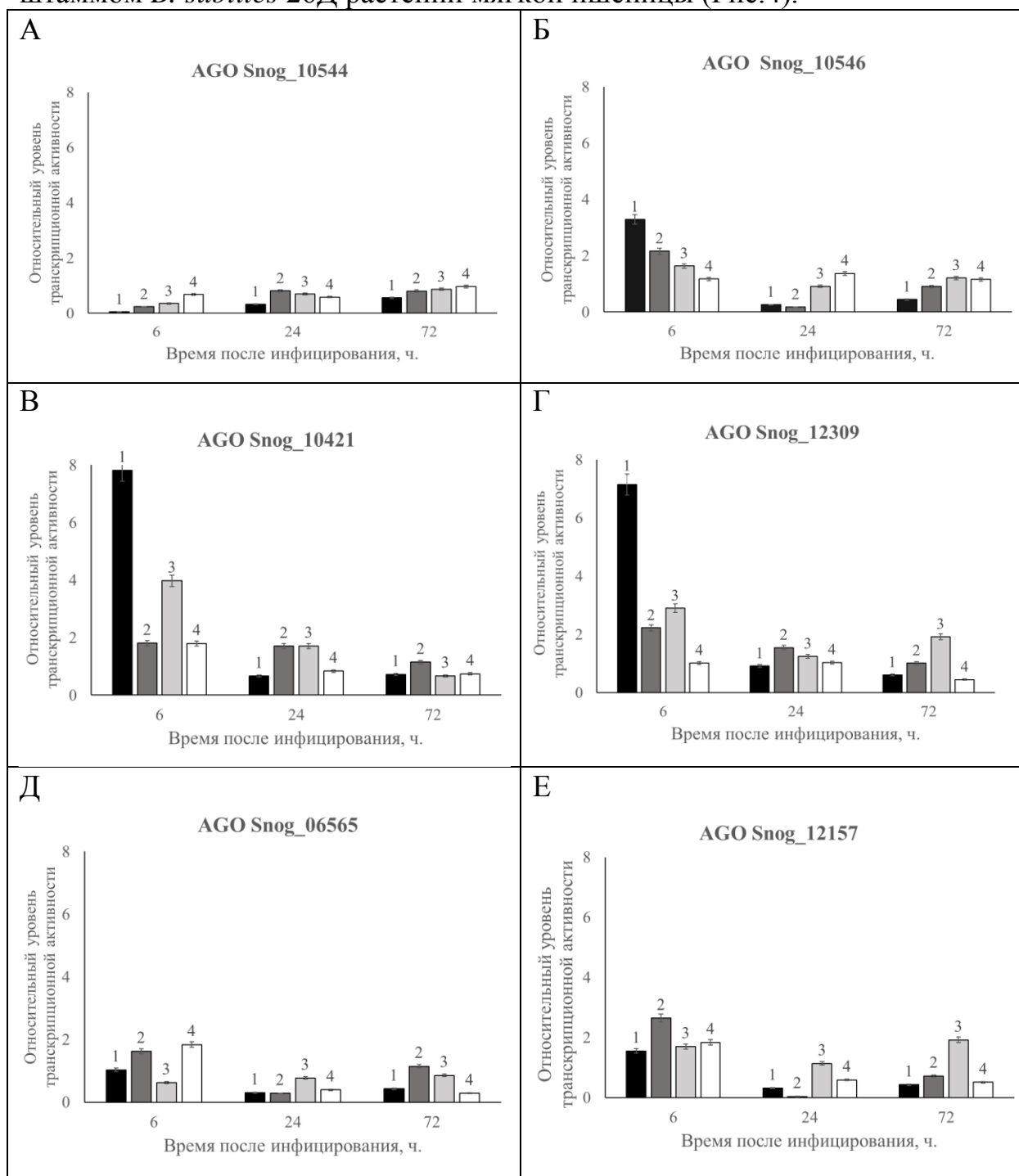


Рисунок 3. Транскрипционная активность генов *SnAGO1*, *SnAGO2* и *SnDCL1* у штаммов 1SP (А, В, Д) и 4ВД (Б, Г, Е) патогенного гриба *S. nodorum* в условиях выращивания на питательной среде, содержащей фитогормоны: 1 – контроль (4 сутки); 2 – АБК (4 сутки); 3 – ЦК (4 сутки); 4 – контроль (7 сутки); 5 – АБК (7 сутки); 6 – ЦК (7 сутки); 7 – контроль (14 сутки); 8 – АБК (14 сутки); 9 – ЦК (14 сутки)

У необработанных штаммов гриба видна тенденция к постепенному повышению активности *SnAGO1* к 7-суточной точке, соответствующей активной фазе споруляции, с последующим снижением на 14е сутки. Сходная тенденция наблюдается у штамма 1SP и по гену *SnAGO2*, но в гораздо меньшей степени, в то время как у штамма 4ВД данный ген и вовсе не проявляет особую активность. Наконец, у обоих штаммов практически отсутствует транскрипционная активность гена *SnDCL1*. Таким образом, высокая активность *SnAGO1* и *SnAGO2* на стадии активной споруляции патогенна может быть связана с необходимостью своевременного определения целевых дцРНК и увеличением концентрации самого гриба, в то время как низкая транскрипционная активность *SnDCL1*, связана с отсутствием этих целевых фрагментов и, возможно – предотвращением «замалчивания» собственных генов.

3.3. Транскрипционная активность генов системы РНКи у патогенного гриба *S. nodorum* в условиях инфицирования и предварительной инокуляции семян штаммом *B.subtilis* 26Д

Далее нами был проведен анализ системы РНКи у патогенного гриба *S. nodorum* в условиях инфицирования предобработанных бактериальным штаммом *B. subtilis* 26Д растений мягкой пшеницы (Рис.4).



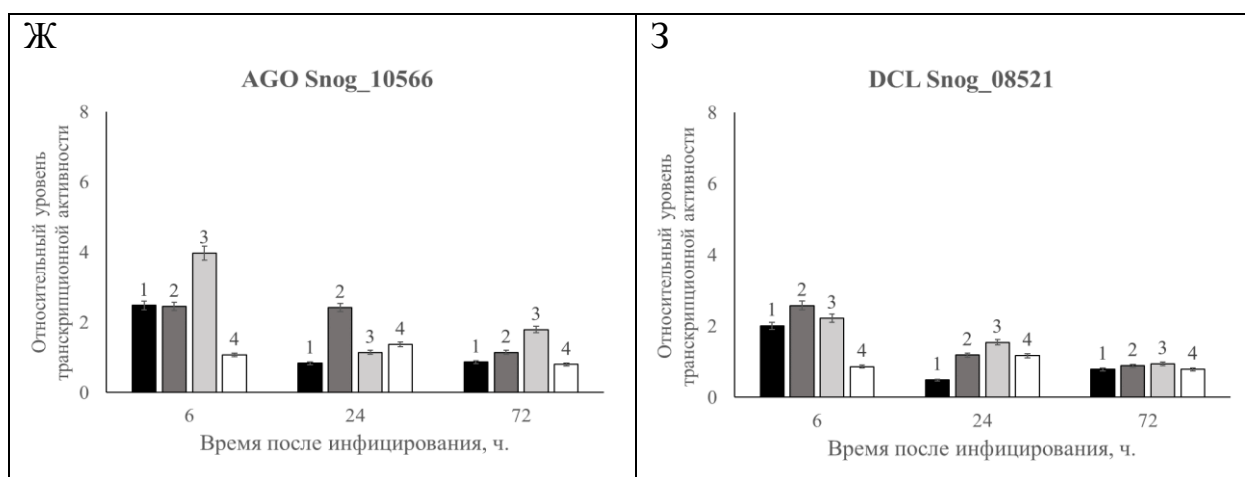


Рисунок 4. Транскрипционная активность генов системы РНКи у патогенного гриба *S. nodorum* Berk при обработке семян контрастных по устойчивости сортов растений пшеницы бактериальным штаммом *B.subtiles* 26Д: 1 – Жница (инфицированная); 2 – Омская 35 (инфицированная); 3 – Жница (инфицированная) + *B.subtiles* 26Д; 4- Омская 35 (инфицированная) + *B.subtiles* 26Д

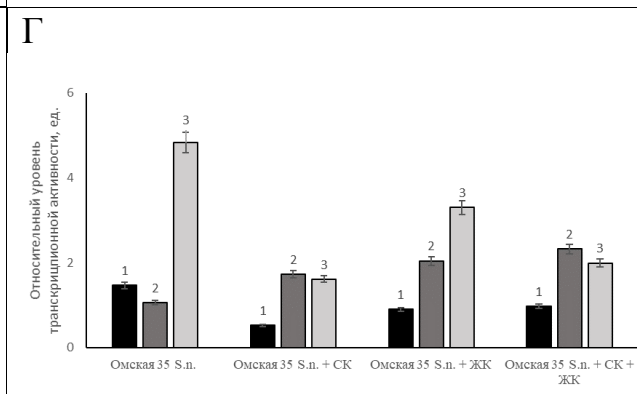
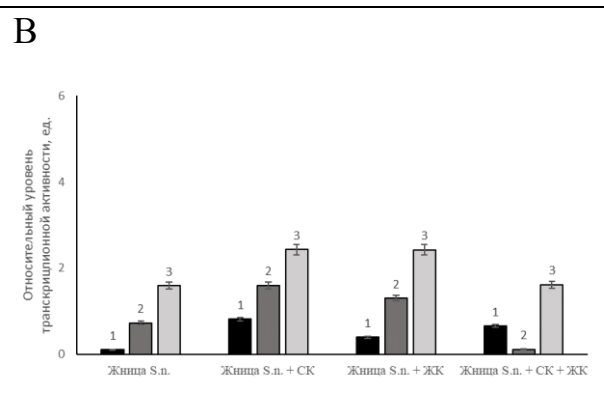
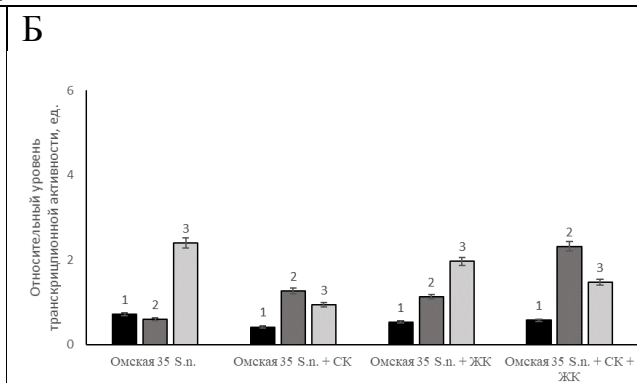
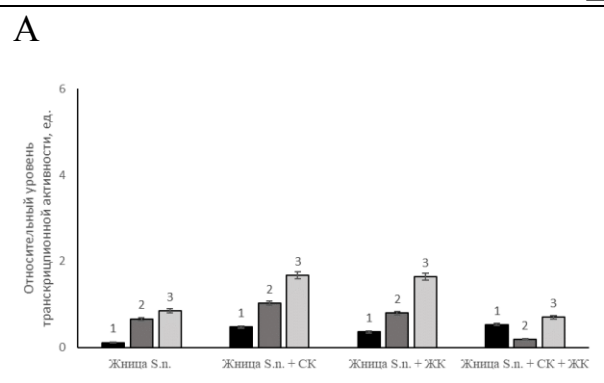
Полученные данные выявили взаимосвязь между работой растительной и грибной системами РНКи: у восприимчивого сорта Жница без обработки штаммом *B.subtiles* 26Д активность грибных генов *SnAGO2* (В) и *SnAGO18* (Г) была значительно выше, чем аналогичная у устойчивого сорта Омская 35. Обработка бактериальным штаммом снижала активность грибных генов РНКи у обоих сортов, однако из диаграмм видно, что различия у сорта Жница ввиду его восприимчивости к грибным локусам *AGO* выражены куда сильнее. Следовательно, именно необходимостью подавлять грибные гены РНКи и неспособностью эффективно делать это без бактериального штамма может объясняться наблюдаемая картина. Вместе с тем, в отличие от сорта Жница, у устойчивого сорта Омская 35 гены РНКи возбудителя септориоза удерживаются примерно на одном уровне в течение суток после инфицирования, что может являться причиной более поздней (вынужденной) и менее выраженной активации системы пшеничной РНКи у данного сорта и что также соотносится с нашими ранее полученными результатами.

3.4. Транскрипционная активность генов системы РНКи у патогенного гриба в условиях инфицирования и предварительной инокуляции семян салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислотами

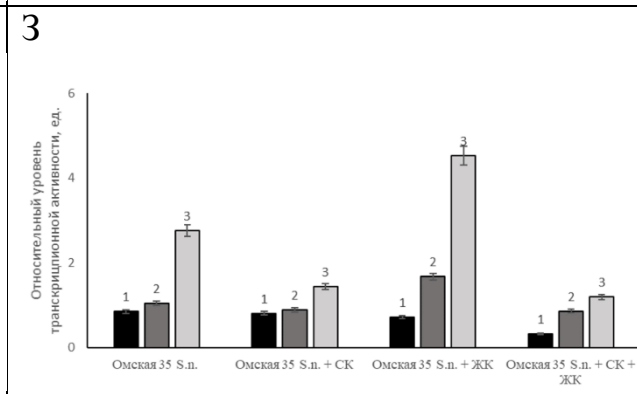
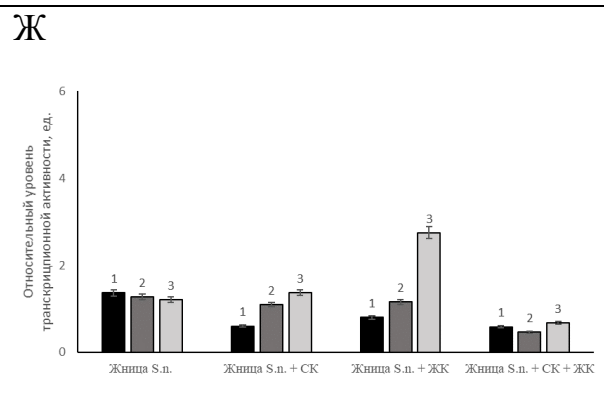
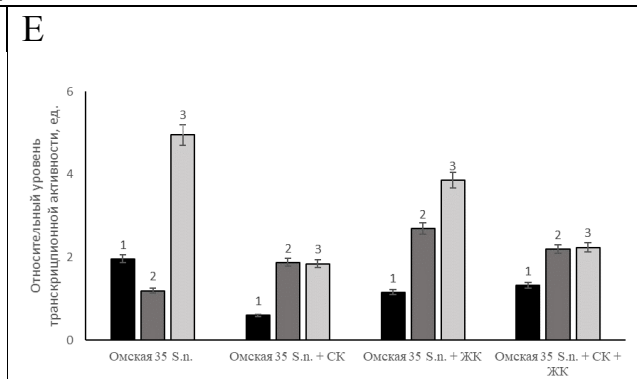
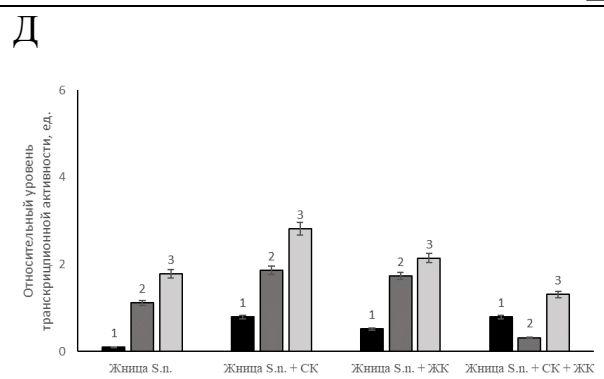
Обработка семян СК и ЖК, а также их композицией, дифференцированно стимулировало накопление транскриптов грибных генов системы РНКи в патогенной системе с обоими сортами пшеницы (Рис.5).

При этом, на фоне активного накопления транскриптов практически всех изученных локусов были обнаружены достоверно-значимые различия в экспрессии генов *AGO* в зависимости от варианта опыта.

SN_AGO1



SN_AGO2



SN_AGO3

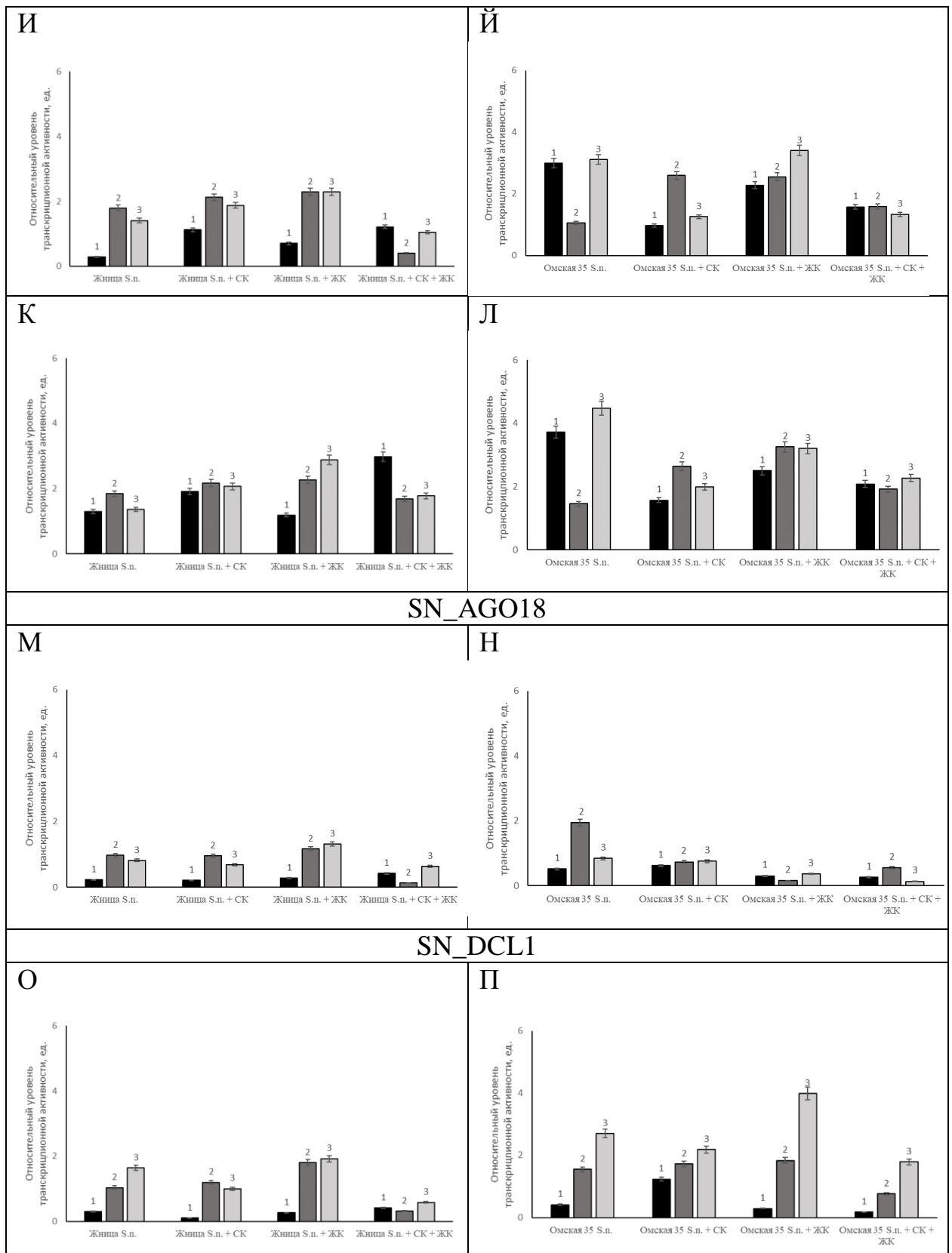


Рисунок 5. Диаграмма транскрипционной активности генов системы РНКи гриба *S. nodorum* при обработке семян растения-хозяина СК и ЖК у восприимчивого сорта Жныца (А) и устойчивого сорта Омская 35 (В) через 6 (1), 24 (2) и 72 (3) часа после инфицирования:

А, Б - Ago - Snog_12157; В, Г - Ago - Snog_10566; Д, Е - Ago - Snog_10544;
Ж, З - Ago - Snog_10421; И, Й - Ago - Snog_10546; К, Л - Ago - Snog_12309,
М, Н - Ago - Snog_06565; О, П - DCL - Snog_08521

Например, гены *AGO*, локализованные в локусах Snog-10566 и Snog-10421 грибного генома экспрессировались в инфицированных растениях пшеницы, предобработанных ЖК, в большей степени, чем под влиянием СК или их композиции. Обнаружено подавление накопления транскриптов гена *AGO*, локализованного в локусе Snog-06565, в растениях устойчивого сорта в условиях предобработки семян как СК, так и ЖК. Учитывая увеличения площади поражения листа (Рис.1) и резкое накопление транскриптов генов пшеничной РНКи у данного сорта на этой же (24-часовой) точке (Рис.5) можно заключить, что первые 6 часов растения данного сорта успешно дают отпор патогену при помощи других систем, однако через сутки после инфицирования активируется хозяйская система РНКи для борьбы с системой РНКи патогена, ввиду чего активность грибной РНКи – снижается. К 72 часам после инфицирования листа, вероятно, уже не могут давать патогену эффективный отпор на фоне его распространения и повышающейся в ответ активности грибной РНКи. Эффект от обработки СК не сильно отличался от аналогичного эффекта от обработки ЖК, в то время как совместная обработка СК+ЖК более выражено подавляло активность генов РНКи гриба (в частности генов *Ago2*, *Ago3* и *DCL1*), что, впрочем, может быть связано с малой активностью растительных генов РНКи и, следовательно – отсутствием необходимости у патогена активировать данную систему против генов растения-хозяина.

3.5. Транскрипционная активность генов системы РНКи у растения пшеницы в условиях инфицирования

На ранних этапах проведенного исследования нами было проведено сравнение транскрипционной активности растительных генов РНКи у разных видов и сортов пшеницы (Рис.6).

У устойчивого сорта Тулайковская 108 наблюдалась активация гена *TaAGO* через 6 часов после инфицирование и снижение активности *TaDCLA* через 24 часа после инфицирования, соответственно. В тоже время у средневосприимчивого сорта Салават Юлаев наблюдалась противоположная картина: активация *TaDCLA* через 24 часа и небольшое снижение активности *TaAgo1* через 6 часов после инфицирования.

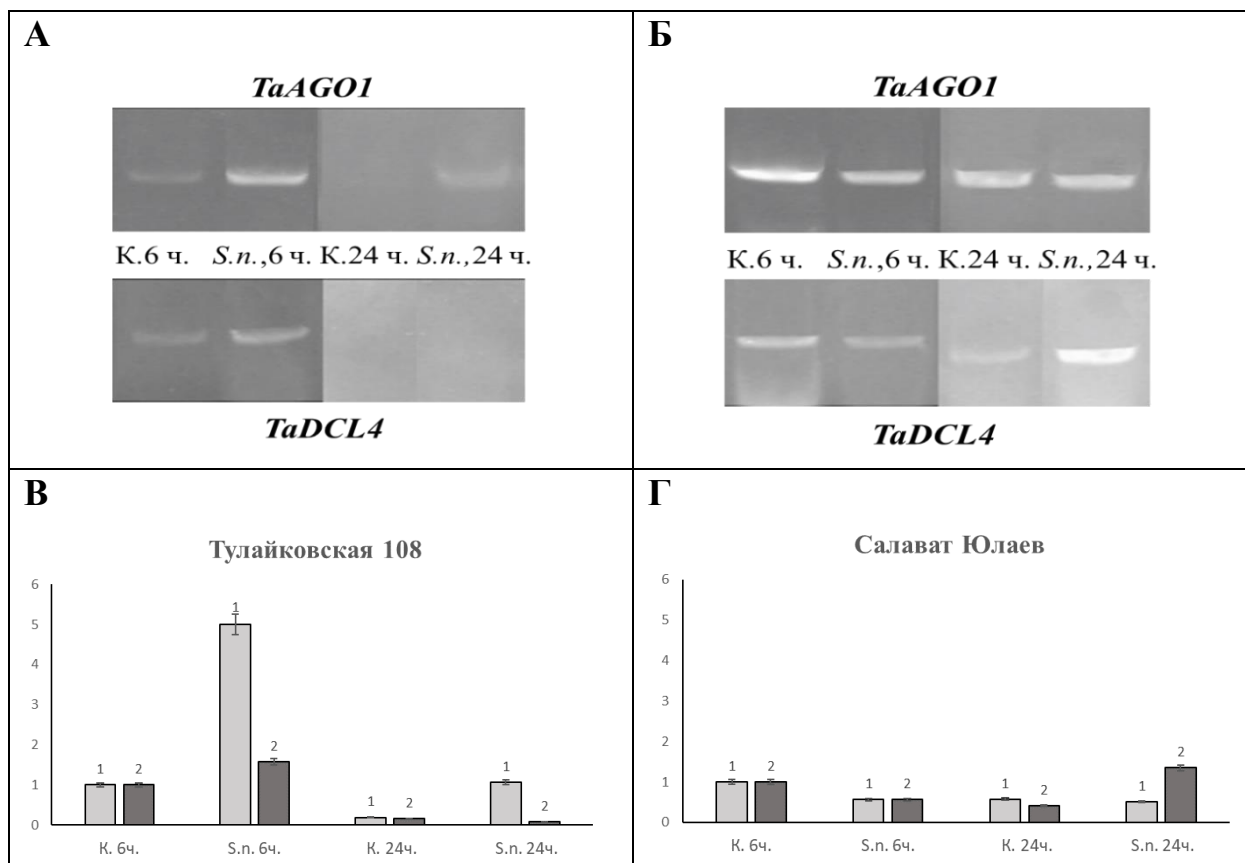


Рисунок 6. Транскрипционная активность генов *TaAgo1* (1) и *TaDCL4* (2) у устойчивого (А,В) сорта Тулайковская 10 и средневосприимчивого сорта (Б, Г) Салават Юлаев по результатам анализа электрофореза и ПЦР в реальном времени

3.6. Транскрипционная активность генов системы РНКи у растений пшеницы в условиях инфицирования и предварительной инокуляции семян штаммом *B. subtilis* 26Д

Далее нами была проведена оценка влияния бактериального штамма *B.subtilis* 26Д, основы биопрепарата Фитоспорин-М. В первую очередь, основываясь на литературных данных о противовирусной активности, мы оценили активность гена *DCL4* на обработанных данным штаммом растениях восприимчивого сорта Жница через 24 часа после инфицирования (Рис.7).

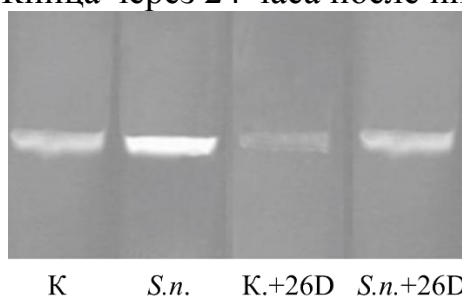
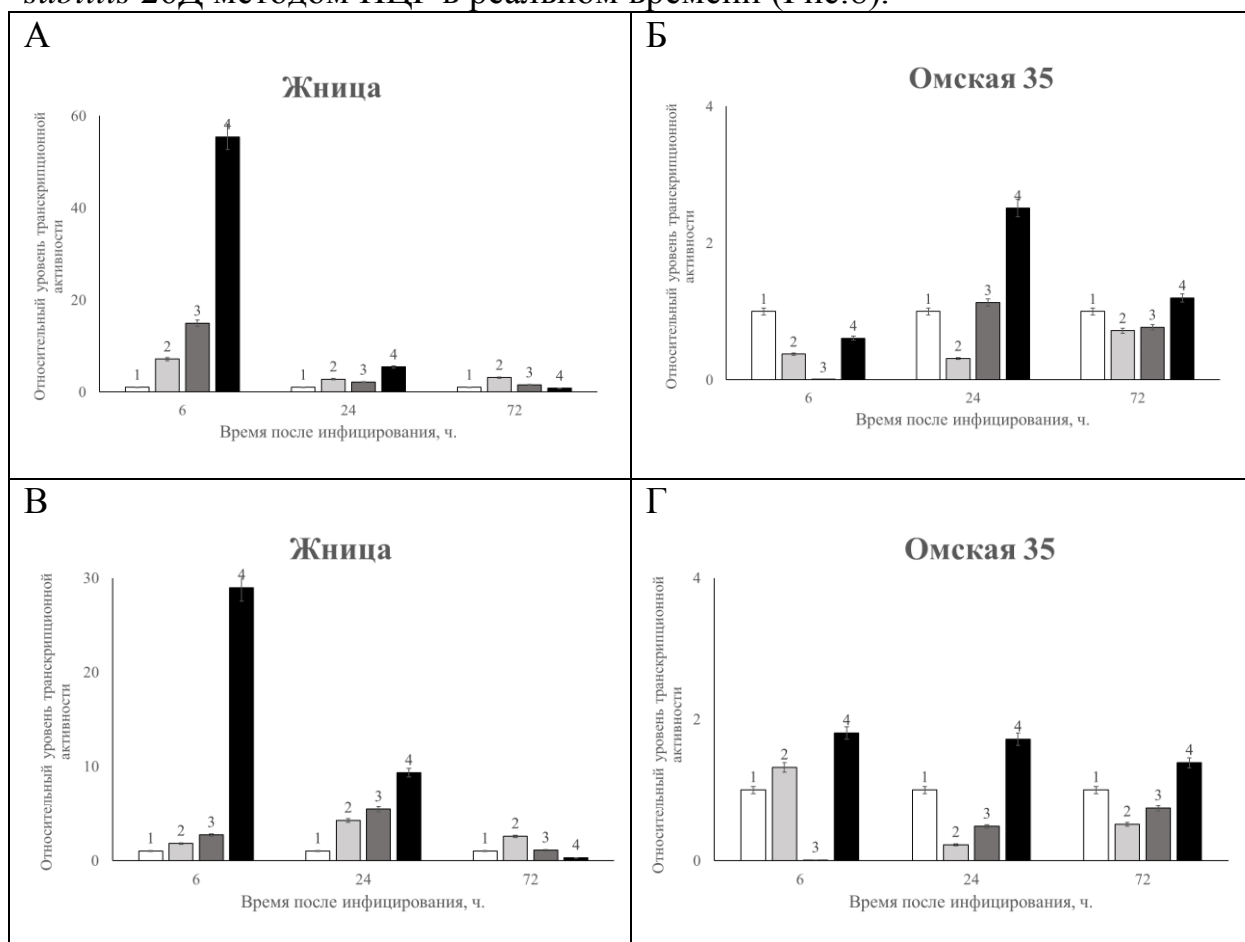


Рисунок 7. Результат электрофореза при анализе активности гена *TaDCL4* у восприимчивого сорта Жница через 24 часа после инфицирования

Было показано, что инфицирование патогеном *S. nodorum* вызывало в растениях пшеницы сорта Жница накопление транскриптов гена *TaDCL4*, ответственного за образования коротких двуцепочечных РНК. В тоже время, инокуляция эндофитной бактерией *Bacillus subtilis* 26Д, основой биопрепарата Фитоспорин-М, снижала транскрипционную активность гена *TaDCL4*. Мы предположили, что бактерия, снижая активность гена *TaDCL4*, препятствовала «замалчиванию» экспрессии защитных генов пшеницы и стимулирует у растений иммунный ответ.

Далее, мы оценили транскрипционную активность генов семейств *AGO* и *DCL* пшеничной системы РНК-интерференции у контрастных сортов Жница и Омская в условиях инокуляции бактериальным штаммом *Bacillus subtilis* 26Д методом ПЦР в реальном времени (Рис.8).



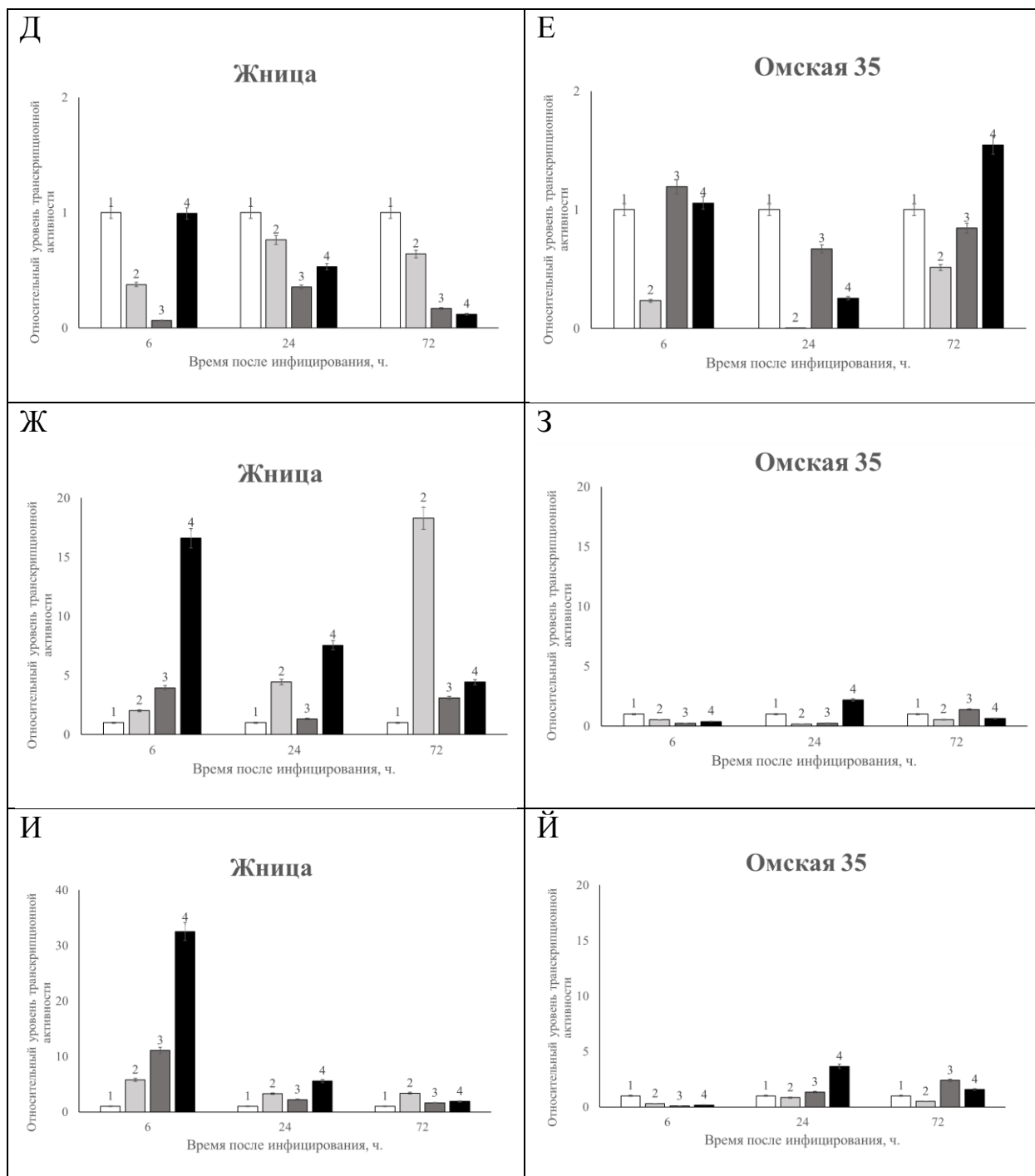


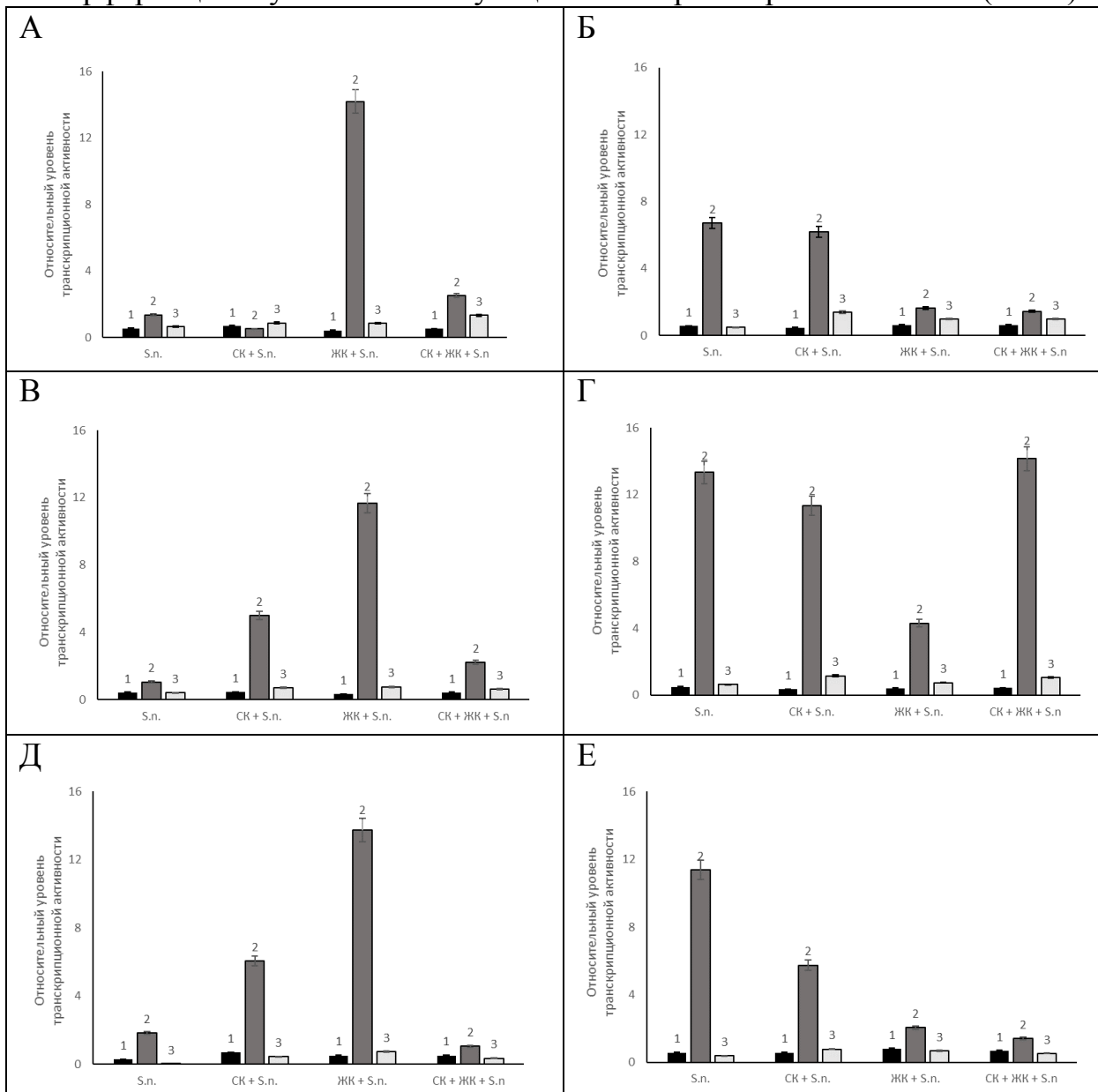
Рисунок 8. Транскрипционная активность генов *TaAGO1* (А, Б), *TaAGO2* (В, Г), *TaAGO4* (Д, Е), *TaDCL2* (Ж,З) и *TaDCL4* (И,Й) у восприимчивого (Жница) и устойчивого (Омская 35) сортов мягкой пшеницы в условиях инфицирования и при обработке семян бактериальным штаммом *B.subtilis* 26Д: 1-контроль, 2-инфицирование, 3-контроль+ *B.subtilis* 26Д, 4-инфицирование+ *B.subtilis* 26Д

Было установлено, что у восприимчивого сорта Жница наблюдалось выраженное повышение активности генов *TaAGO1*, *TaAGO2*, *TaDCL2*, *TaDCL4* через 6 часов после инфицирование. Вместе с тем, на 24-часовой

точке транскрипционная активность исследуемых генов у данного сорта была меньшей, что подтвердило наши результаты электрофореза. Вместе с тем, было установлено, что инокуляция бактериальным штаммом существенно повышала активность генов растительной РНКи в условиях инфицирования. Примечательно также, что у устойчивого сорта Омская 35 повышение активности исследуемых генов было выражено в гораздо меньшей степени и только через 24 часа после инфицирования.

3.7. Транскрипционная активность генов системы РНКи у растений пшеницы в условиях инфицирования и предварительной инокуляции семян салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислотами

В рамках проведения данной работы нами также был проведен анализ транскрипционной активности генов растительной и грибной системы РНК-интерференции в условиях инокуляции семян растворами СК и ЖК (Рис.9).



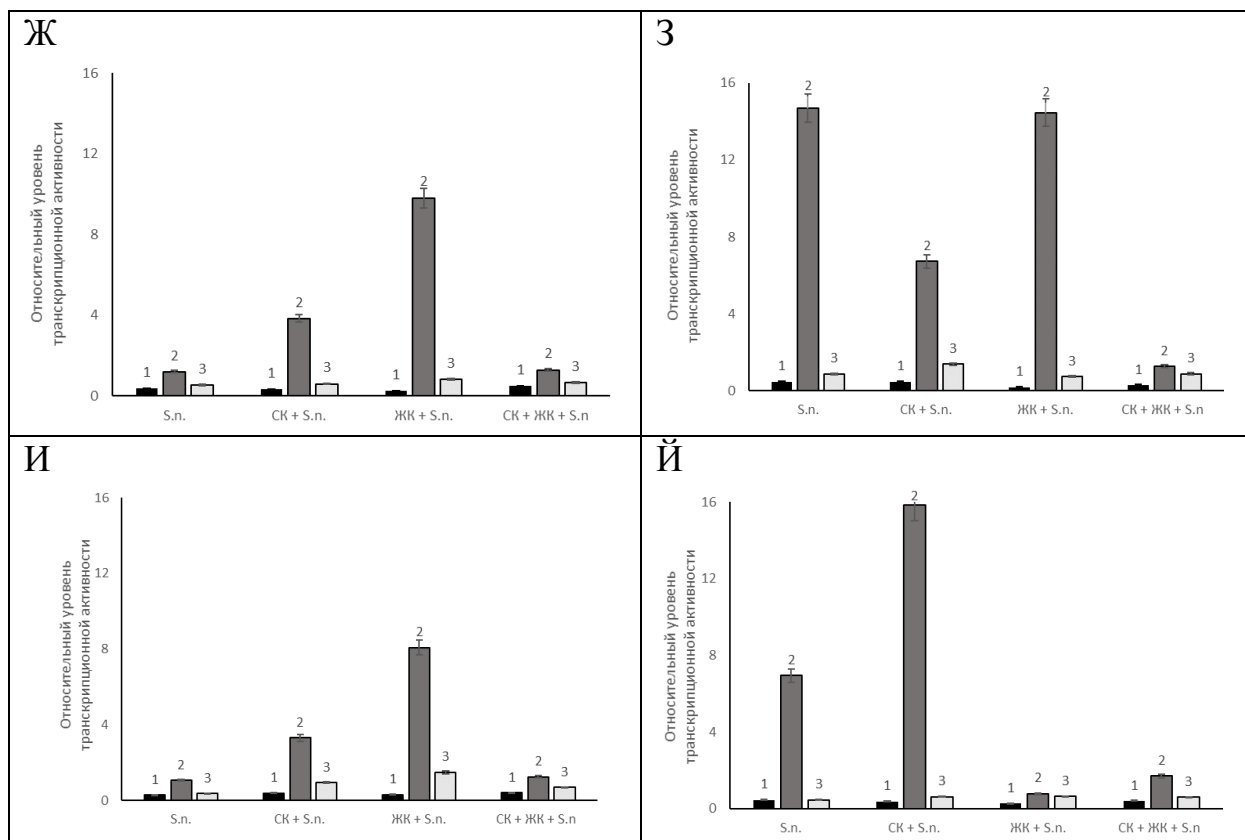


Рисунок 9. Транскрипционная активность генов системы РНКи *TaAGO1* (А, Б), *TaAGO2* (В, Г), *TaAGO4* (Д, Е), *TaDCL2* (Ж,З) и *TaDCL4* (И,Й) у восприимчивого (Жница – А,В,Д,Ж,И) и устойчивого (Омская 35 – Б,Г,Е,З,Й) сортов мягкой пшеницы в условиях инфицирования и при обработке семян СК и ЖК через (1) – 6 часов, (2) – 24 часа и (3) – 72 часа после инфицирования

В результате было установлено, что предварительная обработка семян СК и ЖК действительно оказывала влияние на активность генов системы РНКи у растений пшеницы через 24 часа после инфицирования. На необработанных образцах у восприимчивого сорта «Жница» наблюдалось постепенное накопление транскриптов исследуемых генов во времени, что соотносится с ранее полученными результатами из опыта с бактериальным штаммом. Вместе с тем, у устойчивого сорта «Омская 35» была гораздо сильнее выражена транскрипционная активность генов РНКи на 24-часовой точке фиксации. Стоит также отметить, что у «Жницы» активация компонентов РНКи в большей степени вызывалась ЖК, в то время как у сорта «Омская 35» аналогичный эффект вызывался СК. Эффект от совместной обработки СК+ЖК не сильно отличался от контрольных значений.

3.8 РНК-азная активность у контрастных к *S. nodorum* сортов пшеницы в условиях инфицирования и предобработки семян СК и ЖК

В рамках исследования системы РНКи нами также была оценена РНК-азная активность контрастных по устойчивости к септориозу сортов пшеницы

Жница и Омская 35 в условиях инфицирования и предобработки семян СК и ЖК (Рис.10).

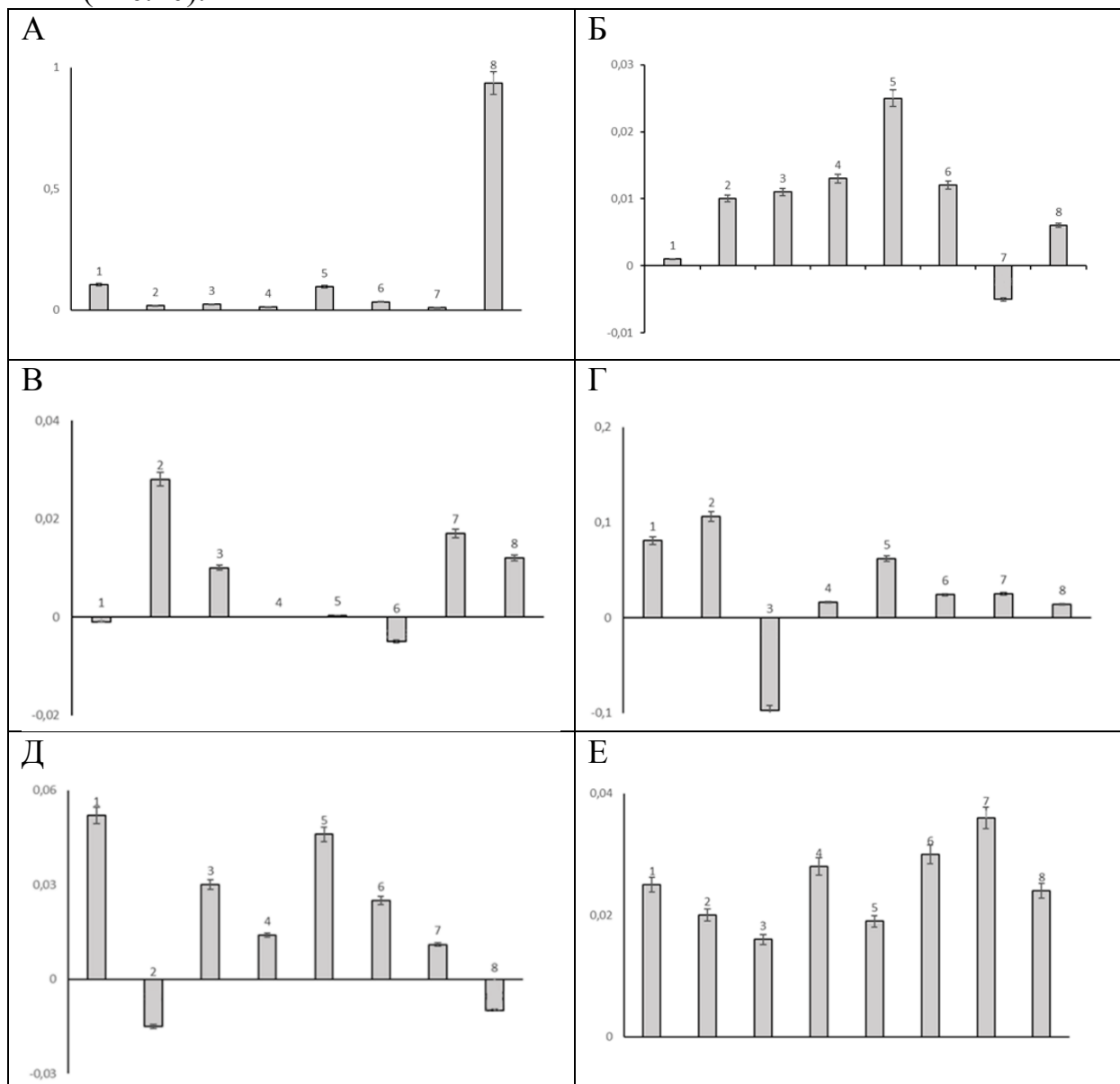


Рисунок 10. Диаграмма РНК-азной активности у восприимчивого сорта Жница (А, В, Д) и устойчивого сорта Омская 35 (Б, Г, Е) в условиях поражения листьев грибом *S. nodorum* и предобработки семян СК и ЖК через 6 часов (А, Б), 24 часа (В, Г) и 72 (Д, Е) часа после инфицирования: 1 – контроль; 2- *S.n.*; 3- СК; 4- СК+*S.n.*; 5 – ЖК; 6 – ЖК + *S.n.*; 7 – СК+ЖК; 8 – СК+ЖК+*S.n.*

Как видно из полученных результатов, у восприимчивого сорта Жница наблюдалось выраженное повышение РНК-азной активности на 6-часовой и (менее выраженное) на 24-часовой точках фиксации при одновременной предобработке семян СК и ЖК. У устойчивого сорта Омская 35 наблюдалось постепенное увеличение РНК-азной активности во времени. В тоже время, в отличие от восприимчивого сорта Жница, при инфицировании и обработке

СК и ЖК у устойчивого сорта РНК-азная активность повышалась уже через 6 часов после инфицирования и была более выраженной по сравнению с контролем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные молекулярные и биохимические исследования супрессоров фитоиммунных реакций различного происхождения значительно расширили представления о всей сложности процесса РНКи, а также заметно углубили наше понимание природы взаимоотношений между растениями и патогенами. Кроме того, на сегодняшний день идентифицированы уже тысячи коротких регуляторных РНК, а сам механизм РНКи на отдельных растительных объектах, например, на арабидопсисе, подробно изучен. Однако, бесспорно, что 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 механизмы РНКи в растительных клетках независимы от индуцируемых ПАМПП 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 механизмов РНКи в условиях формирования многоуровневого растительного микробиома, состоящего, как минимум, из патогена и эндوفита и/или симбионта как, например, в системе “хозяин – патоген –эндофитная бактерия” (Рис.11).

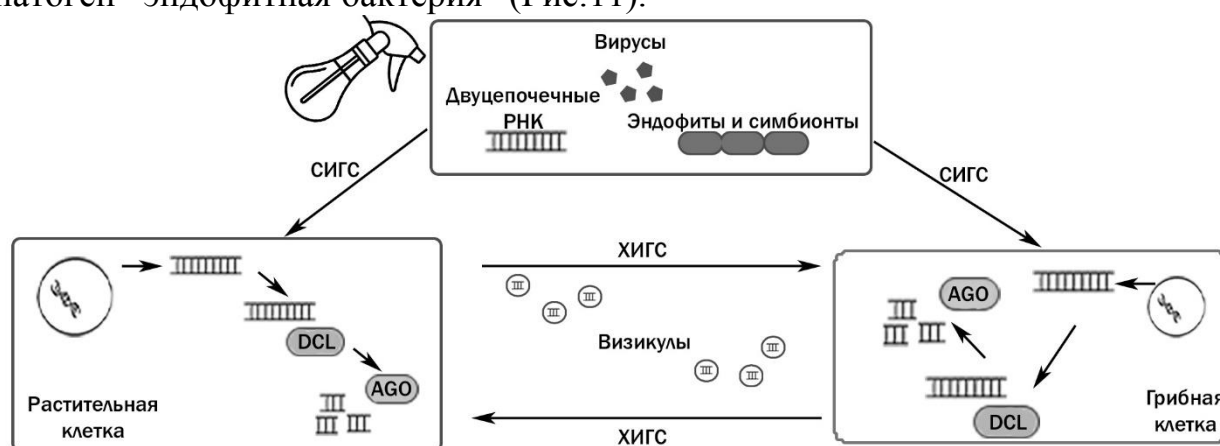


Рисунок 11. Схема взаимодействия компонентов систем РНК-интерференции у различных организмов в патосистеме

С одной стороны, поскольку механизм РНКи является естественным 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. С другой стороны, поскольку при использовании экзогенных дцРНК целевые эффекты достигаются без изменения структуры генома растений, на них не должны распространяться запреты, связанные с использованием ГМО. Таким образом, экзогенное применение молекул дцРНК с потенциалом запуска РНКи является мощным инструментом в современных платформах защиты растений и улучшения урожая, учитывая политическое и общественное давление для устойчивого решения текущих сельскохозяйственных проблем. Вместе с тем, при явном положительном защитном эффекте целевых дцРНК в экспериментальных условиях, остаются вопросы по подбору гиперпродукторов дцРНК, массовому накоплению целевого продукта, обеспечению его сохранности и использования в полевых условиях для защиты растений от патогенов и вредителей.

ВЫВОДЫ

1. Быстрый ответ генов, кодирующих белки семейств AGO и DCL, системы РНК-интерференции пшеницы предполагает их активное вовлечение в формирование защитной системы растения пшеницы против возбудителя септориоза *Staganospora nodorum* Berk.

2. Накопление транскриптов генов *SnAGO1* и *SnAGO2* одного и того же штамма в большей степени в устойчивых растениях и при иммунизации растений салициловой и жасмоновой кислотами предполагает, что гриб использует продукты экспрессии этих генов для преодоления защитной системы растений.

3. Выраженная транскрипционная активность генов семейств AGO и DCL пшеницы в условиях инокуляции растений бактериальным штаммом *B.subtilis* 26Д, компонента биопрепарата Фитоспорин–М, предполагает активацию системы РНКи в качестве защитного механизма против патогена.

4. Соответствие высокой степени экспрессии генов *SnAGO1* и *SnAGO2* фазе формирования конидий предполагает важную роль продуктов экспрессии этих генов в этом процессе.

5. Предложена возможность использования показателя *SnTUB* /*TaRLI* для оценки устойчивости различных сортов, а также оценки воздействия на растения индукторов фитоиммунитета различной природы.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи из изданий, рекомендованных ВАК

1. Maksimov I.V., Sorokan' A.V., Burkhanova G.F., Veselova S.V., Alekseev V.Yu., **Shein M.Yu.**, Khairullin R.M., ect. all Mechanisms of Plant Tolerance to RNA Viruses Induced by Plant-Growth- Promoting Microorganisms // *Plants* 8:575, December 2019.
2. Maksimov, I.V., Sorokan, A.V., **Shein, M.Yu.**, Khairullin, R.M. Biological Methods of Plant Protection against Viruses: Problems and Prospects // *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2020, 56(6), p. 624–637
3. Максимов И.В., **Шейн М.Ю.**, Бурханова Г.Ф. РНК-интерференция в защитных системах растений // *ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ*, 2021, том 68, No 3, с. 1–15 DOI: 10.31857/S0015330321030131 Q2
4. **М.Ю. Шейн**, Г.Ф. Бурханова, А.Ю. Мерзлякова, И.В. Максимов Изменение транскрипционной активности генов *TAAGO2* и *TAAGO4* в растениях пшеницы при инфицировании грибом *Stagonospora nodorum* Berk // Труды Кубанского государственного аграрного университета 2021, выпуск 92, стр. 196., ISSN: 1999-1703

Статьи в других журналах и материалах конференций

1. Максимов И.В., **Шейн М.Ю.**, Хайруллин Р.М. ЭНДОФИТНЫЕ БАКТЕРИИ И ФИТОИММУНИТЕТ // Материалы 2-ой Международной научной конференции PLAMIC2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» 5-9 октября 2020 г., Саратов / отв. Ред. И.А. Тихонович – 2020. – 312 с. – ISBN 978-5-7011-0816-3 p.160
2. **Шейн М.Ю.**, Максимов И.В. РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ В ИММУНИТЕТЕ РАСТЕНИЙ // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ» Екатеринбург, 12-14 ноября 2018 г. Elibrary: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=39143913>
3. **Шейн М.Ю.**, Бурханова Г.Ф., Максимов И.В. ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ *DCL* И *AGO* В РАСТЕНИЯХ ПШЕНИЦЫ ИНФИЦИРОВАННЫХ *Stagonospora nodorum* BERK И ПРИ ОБРАБОТКЕ БАКТЕРИЯМИ *VACILLUS* spp. // Сборник материалов II Международной научно-практической конференции «СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ», Екатеринбург, 16–18 ноября 2020
4. **Shein M.Yu.**, Burkhanova G.F., Maksimov I.V. The role of RNA interference in the formation of protective systems of a wheat plant (*Triticum*) // Conference: IX Congress of society physiologists of plants of Russia "Plant physiology is the basis for creating plants of the future", January 2019. DOI: 10.26907/978-5-00130-204-9-2019-478 Q2
5. **Шейн М.Ю.**, Мерзлякова А.Ю., Бурханова Г.Ф., Максимов И.В. Влияние инфицирования грибом *Stagonospora nodorum* на транскрипционную активность гена *Ago1* в растениях пшеницы // Сборник статей Международной научно-практической конференции WORLD SCIENCE: PROBLEM AND INNOVATIONS г. Пенза, 28 февраля 2021г.

6. **Shein M.Yu.**, Burkhanova G.F., Maksimov I.V. The bacterial impact on the transcriptional activity of DCL2 and DCL4 genes in wheat plants infected with *Staganospora nodorum* //The 6th international Scientific Conference PLANT GENETICS, GENOMICS, BIOINFORMATICS AND BIOTECHNOLOGY (PlantGene2021) Novosibirsk, 14-18 June 2021

Список сокращений: 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); 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); СПУ – системная приобретенная устойчивость (SAR – systemic acquired resistance); S.n. – *Staganospora nodorum*; АБК – Абсцизова кислота; ЦК – цитокинины.