

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)

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа - 2024

Работа выполнена в лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

| | |
|------------------------------|--|
| Научный руководитель: | Максимов Игорь Владимирович доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН |
| Официальные оппоненты | Щербань Андрей Борисович доктор биологических наук, заведующий лабораторией инновационных средств защиты растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН) Ямбаев Юлай Аглямович Доктор биологических наук, профессор, заведующий научно-образовательным центром Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный аграрный университет» (ФГБОУ ВО БГАУ) |
| Ведущая организация | Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН» (ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН) |

Защита диссертации состоится «27» марта 2024 г. в «10.00» часов на заседании диссертационного совета 24.1.218.01 при Уфимском федеральном исследовательском центре Российской академии наук по адресу: 450054, г. Уфа, пр. Октября, 71, конференц-зал ИБГ УФИЦ РАН (ком. № 406).

С диссертацией можно ознакомиться на сайтах ВАК РФ и УФИЦ РАН (<http://ufaras.ru/?dissovet-24121801=диссертация-шеина-михаила-юревича>)

e-mail: dissovet-ibg@mail.ru

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного
совета 24.1.218.01
доктор биологических наук, доцент

Гульназ Фаритовна Корытина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Постановка проблемы и ее актуальность. Фитопатогены 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. В этих условиях перспективными и экологически безопасными способами повышения устойчивости растений является поиск генетических механизмов стимулирования естественных фитозащитных реакций.

Недавно открытое явление РНК-интерференции (РНКи) — это эволюционно сформировавшийся процесс управления активностью генов посредством коротких РНК и специальных белковых комплексов у эукариот (Fire et al., 1998). Это направление исследований является одной из наиболее бурно развивающихся областей молекулярной биологии и геномики. Он открыл новые возможности в развитии эко-технологий для улучшения растений за счет регуляции активности специфических генов, 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, 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 мРНК 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. 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 гриб *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 *S. 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 *Bacillus 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*. 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.

Положения, выносимые на защиту.

1. Компоненты системы РНК-интерференции (гены *DCL* и *AGO*) вовлечены в процесс формирование защитного ответа растений пшеницы на инфицирование патогенным грибом *S. nodorum*.

2. РНК-интерферирующие системы растения-хозяина и патогенного гриба *S. nodorum* влияют друг на друга и находятся в антагонистических отношениях.

3. Предобработка растений пшеницы индукторами защитного ответа – суспензиями СК, ЖК и штаммом *Bacillus subtilis* 26Д, оказывала влияние на активность генов DCL и AGO как растения пшеницы, так и патогенного гриба.

4. Копия гена *TaAGO1* на хромосоме 7D играет ключевую роль в геномной реализации экспрессии этого гена у растений мягкой пшеницы.

Личный вклад автора. Личный вклад соискателя заключается в постановке цели и задач, планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе полученных данных, подготовке публикаций и диссертационной работы.

Степень достоверности результатов проведенных исследований. Достоверность полученных данных подтверждается воспроизводимостью и многочисленностью проведённых экспериментов, а также с использованием биоинформационных методов и программ. Выводы, сформулированные по результатам диссертационной работы, соответствуют поставленным задачам.

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.

Соответствие диссертационной работы паспорту научной специальности. Диссертационное исследование соответствует паспорту научной специальности 1.5.7. Генетика, охватывающей направления: 9. Реализация генетической информации (транскрипция, трансляция). Механизмы регуляции экспрессии генов. Взаимодействие генов; 17. Частная генетика микроорганизмов, растений и животных. Геносистематика. Филогенетика; 25. Прикладные аспекты генетики. Использование генетики в криминалистике, идентификации личности, систематике, диагностике и др.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на IX Съезде 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 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 из них 4 индексируемых в международных базах Scopus и Web of Science.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, д.б.н., проф. Максимова И.В. за ценные советы и всестороннюю поддержку на всех этапах выполнения работы, всем сотрудникам лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН за предоставления материальной базы, помощь в проведении лабораторных исследований и обсуждении данной работы. Также автор выражает искреннюю благодарность научным сотрудникам ИБГ УФИЦ РАН к.б.н. Бурхановой Г.Ф. и к.б.н. Михайловой Е.В., за помощь в освоении методов работы и программного обеспечения для проведения данного диссертационного исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Эксперименты проводились на растениях пшеницы (*T. aestivum* L.) двух контрастных по устойчивости к грибу *S. nodorum* сортов: Жница (восприимчивый) и Омская 35 (устойчивый). Для оценки экспрессионной активности генов системы РНК-интерференции использовали высоковирулентный в отношении мягкой пшеницы *T. aestivum* штамм гриба *S. nodorum* - SnB.

Постановка экспериментов. Опыты проводили в лабораторных условиях, где растения выращивали при комнатной температуре (20-22°C) 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 и проращивали в эмалированных кюветах на влажной фильтровальной бумаге. Полностью развернутые первые листья 7-суточных проростков срезали и помещали в чашки Петри на влажную вату с добавлением бензимидазола (40 мг/л). В экспериментах предварительное предпосевное замачивание семян производили водными растворами салициловой (СК) и жасмоновой кислот (ЖК), а также бактериальной суспензией штамма *B. subtilis* 26Д, как индукторов иммунной системы растений. Конечные концентрации растворов, использованных в большинстве экспериментов (СК - 10^{-5} М и ЖК - 10^{-7} М, а также суспензия бактерий *B. subtilis* 26Д - 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* (Бурханова и др. 2017). Для оценки активности генов системы РНКи у гриба *S. nodorum* вне патосистемы,

патоген культивировали на жидкой картофельно-глюкозной среде в чашках Петри с добавлением в среду растворов СК и ЖК в концентрациях 10^{-5} М и 10^{-7} М.

Инфицирование растений. Инфицирование проростков спорами гриба *S. nodorum* проводили путем нанесения на лист микропипеткой суспензии 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.

Оценка степени поражения. Наблюдение за развитием гриба *S. nodorum* в лабораторных условиях проводили ежедневно. Степень поражения растений и проявления симптомов септориоза оценивали по 4-бальной системе, разработанной во ВНИИ фитопатологии (Пыжикова, Карасева, 1986). 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). Для оценки степени развития септориоза нами предложен 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 соответствовали данным по визуальному наблюдению развития болезни на листьях, но в более ранние сроки.

Биоинформационные методы. Биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием генетических баз данных, в частности, NCBI и FunRNA, а для подбора праймеров - «Primer-Blast» (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) и «PrimerQuest Tool» (<https://eu.idtdna.com/Primerquest>).

Молекулярно-биологические методы. Выделение суммарной РНК для оценки уровня транскриптов исследуемых генов проводили с использованием реагента «Тризол» (“Molecular Research Center, Inc.”, США), согласно протоколу фирмы-поставщика. ДНК из листьев растений для последующего секвенирования выделяли фенольно-детергентным методом (Маниатис, 1984). Концентрацию нуклеиновых кислот измеряли на спектрофотометре (ND1000WOC) Thermo Scientific™ NanoDrop™ 1000 при A260/A280. Для синтеза кДНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием M-MuLV обратной транскриптазы (“Синтол”, Россия). 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).

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 гелелектрофореза 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).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика роста патогенного гриба *S. nodorum* у контрастных по устойчивости сортов мягкой пшеницы. Оценка зоны поражения листьев грибом выявила высокую интенсивность формирования инфекционного пятна и быстрое развитие некрозов в листьях сорта Жница, что свидетельствует о высокой степени его поражаемости патогеном. В то же время на листьях сорта Омская 35 болезнь развивалась менее интенсивно (рис. 1). 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 *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). Как видно из рис. 1, соотношение уровня активности транскрипции гена *SnTUB* гриба *S. nodorum* к сходному показателю гена *TaRLI* пшеницы у сорта Жница в течение наблюдаемого периода было намного выше, чем у сорта Омская 35. Таким образом, 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.

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

Вместе с тем, у 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. С учетом динамики развития заболевания (рис. 1), можно полагать, что подобные различия в активности транскрипции исследуемых генов в данном опыте обусловлены различным ответом на инфицирование, а также активацией ряда других генов при формировании иммунного ответа. 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. Учитывая указанные особенности патогенного гриба *S. nodorum*, влияние СК и ЖК на активность генов системы РНКи при поражении растения возбудителем септориоза представляет большой интерес.

Выявлено, что у контрольных растений сорта Жница наблюдалось незначительное (0.5 раз) снижение уровня транскриптов генов семейства *TaAGO* на 6-часовой точке фиксации с последующим накоплением транскриптов, в то время как активность этих генов у устойчивого сорта сохранялась на уровне контрольных

значений (рис. 2, 3, 4). Учитывая динамику протекания заболевания и степень поражения листьев (рис. 1), подобное различие у контрастных по устойчивости к *S. nodorum* сортов может объясняться различным ответом на работу РНК-интерферирующей системы патогена в процессе развития заболевания.

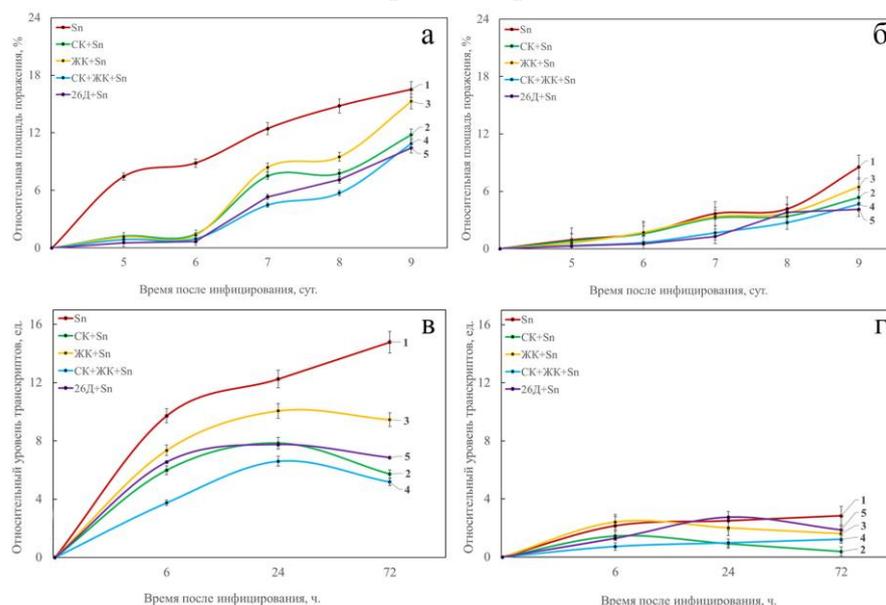


Рисунок 1. Сравнительные показатели площади поражения проростков пшеницы септориозом (а, б) и уровня активности транскрипции гена *SnTUB* гриба *S. nodorum* по отношению к гену *TaRLI* мягкой пшеницы (в, г) в листьях восприимчивого (а, в) и устойчивого (б, г) сортов мягкой пшеницы в норме (1) и после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

Известно также, что СК играет центральную роль в устойчивости хозяина к патогенам, таким как *Pseudomonas syringae* и вируса турнепса *Turnip crinkle virus* (Pieterse et al., 2008). В нашем опыте обработка СК транзитивно повышала у растений сорта Жница при инфицировании накопление транскриптов гена *TaDCL2* в 2 раза по сравнению с контрольными образцами через 6 часов, а также генов *TaAGO1* в 3 раз и *TaAGO4* в 6 раз через 24 часа, соответственно. У сорта Омская 35 продукты гена *TaDCL2* начинали активно нарабатываться к 24-часовой точке (рис. 5), в то время как активность транскрипции гена *TaAGO1* повышалась в 1,5 раза уже на 6 часовой точке фиксации (рис. 2). 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 на этот ген у хозяина для эффективного защитного ответа.

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 (рис. 4), чего не наблюдалось у восприимчивого сорта. С другой стороны, активность генов семейства *DCL* при инфицировании и совместной предобработке не менялась у обоих сортов (рис.5).

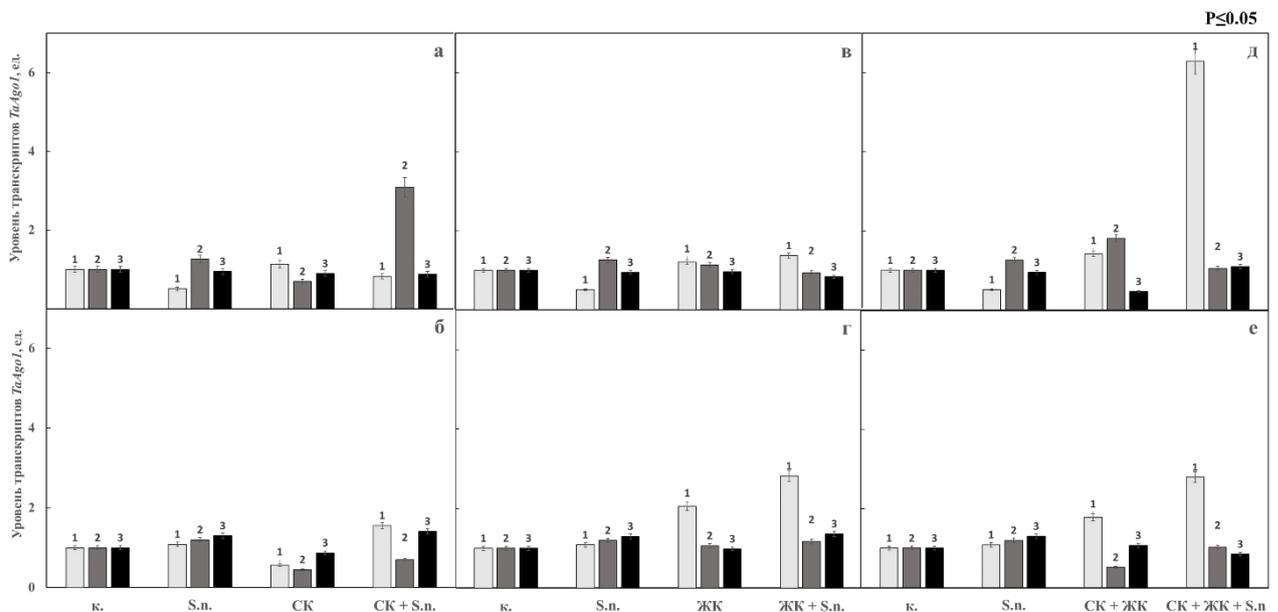


Рисунок 2. Активность транскрипции гена *TaAGO1* у контрастных по восприимчивости к *S. nodorum* сортов мягкой пшеницы Жница (а, в, д) и Омская 35 (б, г, е) при обработке семян СК (а, б), ЖК (в, г) и СК+ЖК (д, е) через 6 (1), 24 (2) и 72 (3) часа после инфицирования.

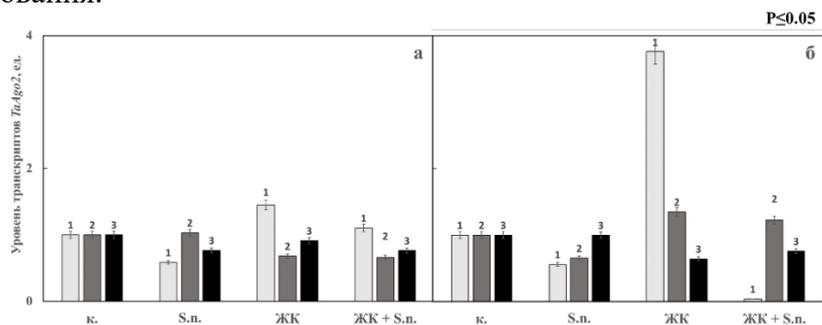


Рисунок 3. Активность транскрипции гена *TaAGO2* у контрастных по восприимчивости к *S. nodorum* сортов мягкой пшеницы Жница (а) и Омская 35 (б) при обработке семян ЖК через 6 (1), 24 (2) и 72 (3) часа после инфицирования.

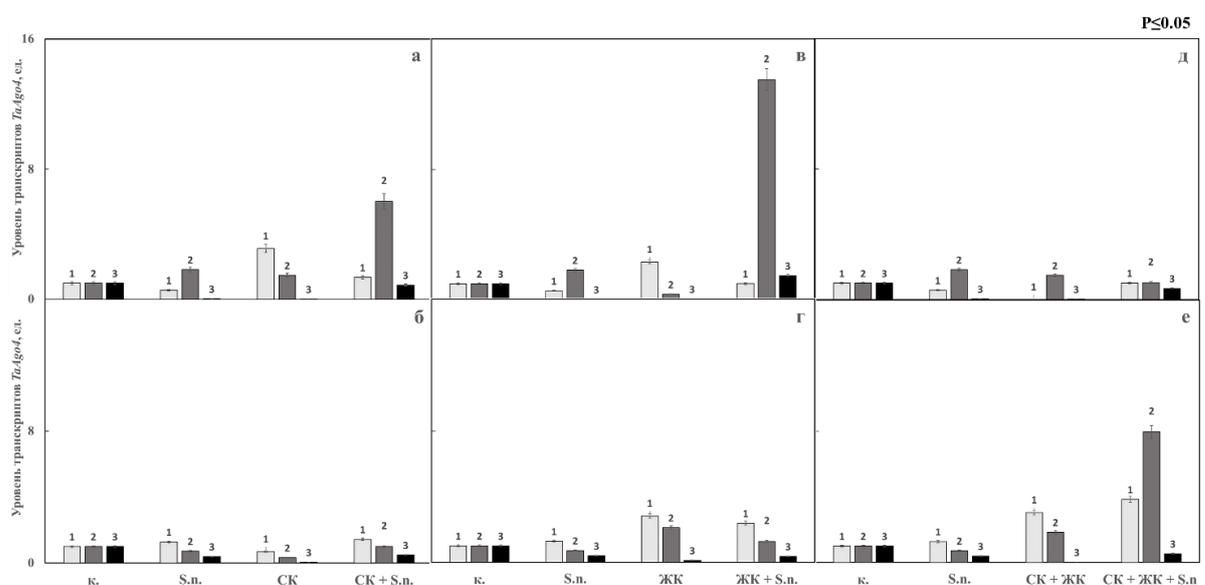


Рисунок 4. Активность транскрипции гена *TaAGO4* в листьях сортов мягкой пшеницы Жница (а, в, д) и Омская 35 (б, г, е) при обработке семян СК (а, б), ЖК (в, г) и СК+ЖК (д, е) через 6 (1), 24 (2) и 72 (3) часа после инфицирования грибом *S. nodorum*.

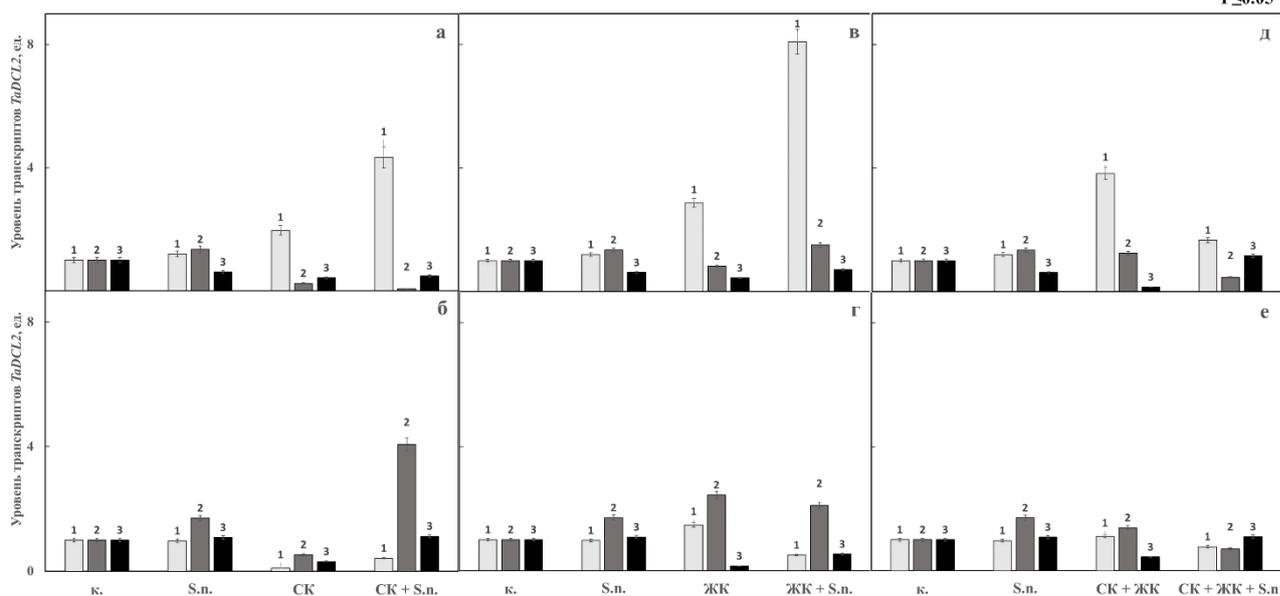


Рисунок 5. Активность транскрипции гена *TaDCL2* в листьях сортов мягкой пшеницы Жница (а, в, д) и Омская 35 (б, г, е) при обработке семян СК (а, б), ЖК (в, г) и СК+ЖК (д, е) через 6 (1), 24 (2) и 72 (3) часа после инфицирования грибом *S. nodorum*.

Ранее упоминалось, что ЖК также играет важную роль в формировании защитного ответа, но против некротрофов и насекомых (Hyun et al., 2008; Rosahl, Feussner, 2004). При обработке семян ЖК на растениях сорта Жница активность гена *TaDCL2* повышалась на 6-часовой в 8 раз (рис. 5), а *TaAGO4* – в 13 раз на 24-часовой точке фиксации (рис. 4), что повторяло аналогичную тенденцию при обработке семян СК у данного сорта.

Однако у 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. 4). 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 растений сорта Жница и в 2,8 раз у растений сорта Омская 35 (рис. 2).

Активность транскрипции генов системы РНКи у растений пшеницы в условиях инфицирования и предварительной инокуляции семян штаммом *B. subtilis* 26Д. Известно, что некоторые эндофиты обладают комплексной инсектицидной и фунгистатической активностью (Чеботарь и др., 2015), а также индуцируют системную устойчивость растений к патогенам различного происхождения, формируя, 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 (Максимов и др., 2020). Поэтому, основываясь на литературных данных, нами была проведена оценка влияния бактериального штамма *B. subtilis* 26Д на активность транскрипции генов системы РНКи пшеницы в условиях инфицирования возбудителем септориоза. Инфицирование патогеном *S. nodorum* в растениях пшеницы сорта

Жница вызывало накопление транскриптов гена *TaDCL4*. В тоже время, исходя из интенсивности свечения на геле, инокуляция клетками бактерии *B. subtilis* 26Д незначительно снижала уровень транскриптов гена *TaDCL4* на 24-часовой точке фиксации. Вероятно, этот штамм, снижая активность гена *TaDCL4*, препятствовал ингибированию экспрессии защитных генов пшеницы и стимулировала таким образом у растений иммунный ответ. 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. 6, 7).

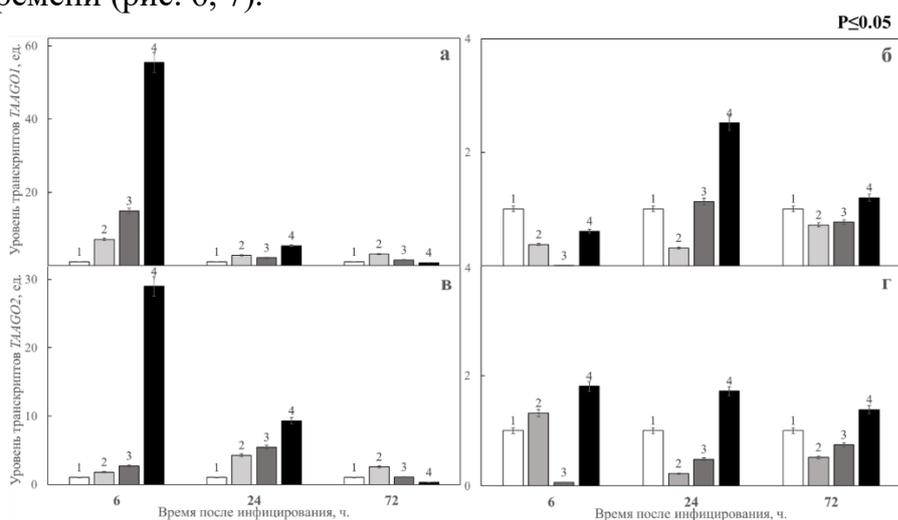


Рисунок 6. Активность транскрипции генов *TaAGO1* (а, б), *TaAGO2* (в, г) у пшеницы Жница (а, в) и Омская 35 (б, г) в условиях инфицирования и при обработке семян бактериальным штаммом *B. subtilis* 26Д: 1- контроль, 2- инфицированные *S. nodorum*, 3- контроль + *B. subtilis* 26Д, 4- инфицирование + *B. subtilis* 26Д.

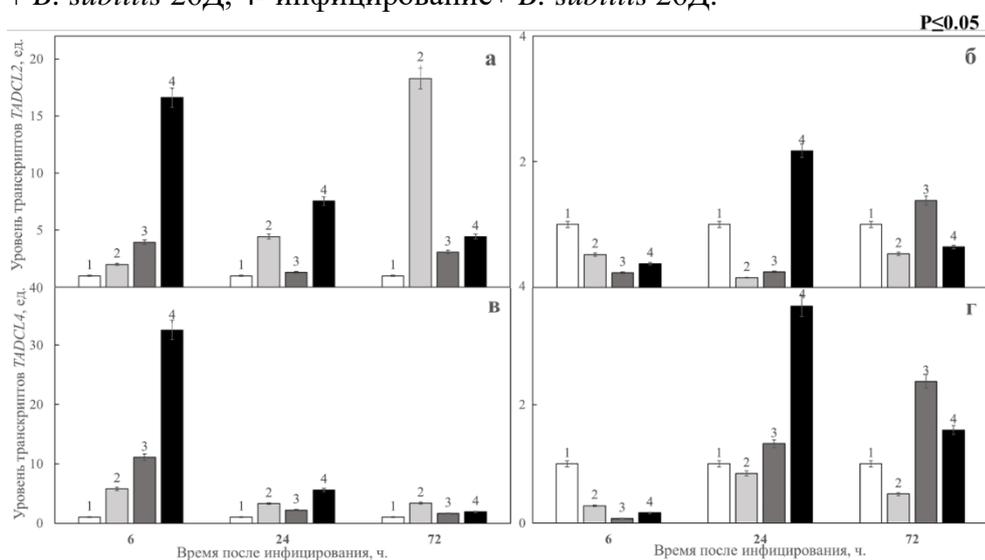


Рисунок 7. Активность транскрипции генов *TaDCL2* (а, б) и *TaDCL4* (в, г) в листьях пшеницы Жница (а, в) и Омская 35 (б, г) в условиях инфицирования грибом *S. nodorum* и при обработке семян бактериальным штаммом *B. subtilis* 26Д: 1 - контроль, 2 - инфицирование, 3 - контроль + *B. subtilis* 26Д, 4 - инфицирование + *B. subtilis* 26Д.

У растений сорта Жница обнаружен выражено высокий уровень транскриптов генов *TaAGO1*, *TaAGO2*, *TaDCL2*, *TaDCL4* через 6 часов после

| Species/Abbrev | DNA Sequences | Translated Protein Sequences |
|--|---|------------------------------|
| 1. T. Urturta 7A | GGTCTCCACAGGGCGGTCACGACAGCAGCAACAGGTTCGGGAAATGTTGCTGTTCAGGCCTCTCCCTGCCCCAAGGAAAAAGCTCAAGCGTGTCAATGTTTACTGC | |
| 2. T. aestivum 7A | GGTCTCCACAGGGCGGTCACGACAGCAGCAGCAACAGGTTCGGGAAATGTTGCTGTTCAGGCCTCTCCCTGCCCCAAGGAAAAAGCTCAAGCGTGTCAATGTTTACTGC | |
| 3. A. Tauchi 7D | GGTCTCCACAGGGCGGTCACGACAGCAGCAGCAACAGGTTCGGGAAATGTTGCTGTTCAGGCCTCTCCCTGCCCCAAGGAAAAAGCTCAAGCGTGTCAATGTTTACTGC | |
| 4. T. aestivum 7D | GGTCTCCACAGGGCGGTCACGACAGCAGCAGCAACAGGTTCGGGAAATGTTGCTGTTCAGGCCTCTCCCTGCCCCAAGGAAAAAGCTCAAGCGTGTCAATGTTTACTGC | |
| 5. T. aestivum Ago1 (Chinese Spring) 7D whole genome | GGTCTCCACAGGGCGGTCACGACAGCAGCAGCAACAGGTTCGGGAAATGTTGCTGTTCAGGCCTCTCCCTGCCCCAAGGAAAAAGCTCAAGCGTGTCAATGTTTACTGC | |
| 6. T. aestivum Ago1 (Chinese Spring) 7D mRNA | GGTCTCCACAGGGCGGTCACGACAGCAGCAGCAACAGGTTCGGGAAATGTTGCTGTTCAGGCCTCTCCCTGCCCCAAGGAAAAAGCTCAAGCGTGTCAATGTTTACTGC | |
| 7. T. aestivum Ago1 (Zhensha) | GGTCTCCACAGGGCGGTCACGACAGCAGCAGCAACAGGTTCGGGAAATGTTGCTGTTCAGGCCTCTCCCTGCCCCAAGGAAAAAGCTCAAGCGTGTCAATGTTTACTGC | |
| 8. T. aestivum Ago1 (Omskaja 35) | GGTCTCCACAGGGCGGTCACGACAGCAGCAGCAACAGGTTCGGGAAATGTTGCTGTTCAGGCCTCTCCCTGCCCCAAGGAAAAAGCTCAAGCGTGTCAATGTTTACTGC | |

Рисунок 9. Выравнивание нуклеотидных последовательностей в программе MEGA11

Более точное выравнивание нуклеотидных последовательностей с помощью алгоритма MUSCLE позволило определить, что различия между исследуемыми сортами и последовательностями из баз данных были несущественными. Тем не менее, на рисунке видно, что рассматриваемый участок нуклеотидной последовательности гена *TaAGO1* различается на хромосомах 7A и 7D. Вместе с тем видно (рис. 9, рис. 10), что сорта пшеницы Жница и Омская 35 имели нуклеотидную и аминокислотную последовательности, идентичные последовательностям на хромосоме 7D, что может свидетельствовать о важности этой копии гена *TaAGO1* в реализации защитного ответа растения пшеницы на инфицирование патогенным грибом *S. nodorum*.

| Species/Abbrev | DNA Sequences | Translated Protein Sequences |
|--|--|------------------------------|
| 1. T. Urturta 7A | ...TPLSIA...IFL...LLVLS...VLLK...P...SVVCLPAV...PAYAA...LAAF...R...R...F...Y...M...P...D...S...G...S...V...A...S...G...A...R...G...P...P...D...G...P...R...S...T...R...F...G...V...A...V...R...R...L...P...A...L...K...E...N...V...K...R...V...M...F...Y...C | |
| 2. T. aestivum 7A | ...TPLSIA...IFL...LLVLS...VLLK...P...SVVCLPAV...PAYAA...LAAF...R...R...F...Y...M...P...D...S...G...S...V...A...S...G...A...R...G...P...P...D...G...P...R...S...T...R...F...G...V...A...V...R...R...L...P...A...L...K...E...N...V...K...R...V...M...F...Y...C | |
| 3. A. Tauchi 7D | ...TPLSIA...IFL...LLVLS...VLLK...P...SVVCLPAV...PAYAA...LAAF...R...R...F...Y...M...P...D...S...G...S...V...A...S...G...A...R...G...P...P...D...G...P...R...S...T...R...F...G...V...A...V...R...R...L...P...A...L...K...E...N...V...K...R...V...M...F...Y...C | |
| 4. T. aestivum 7D | ...TPLSIA...IFL...LLVLS...VLLK...P...SVVCLPAV...PAYAA...LAAF...R...R...F...Y...M...P...D...S...G...S...V...A...S...G...A...R...G...P...P...D...G...P...R...S...T...R...F...G...V...A...V...R...R...L...P...A...L...K...E...N...V...K...R...V...M...F...Y...C | |
| 5. T. aestivum Ago1 (Chinese Spring) 7D whole genome | ...TPLSIA...IFL...LLVLS...VLLK...P...SVVCLPAV...PAYAA...LAAF...R...R...F...Y...M...P...D...S...G...S...V...A...S...G...A...R...G...P...P...D...G...P...R...S...T...R...F...G...V...A...V...R...R...L...P...A...L...K...E...N...V...K...R...V...M...F...Y...C | |
| 6. T. aestivum Ago1 (Chinese Spring) 7D mRNA | ...TPLSIA...IFL...LLVLS...VLLK...P...SVVCLPAV...PAYAA...LAAF...R...R...F...Y...M...P...D...S...G...S...V...A...S...G...A...R...G...P...P...D...G...P...R...S...T...R...F...G...V...A...V...R...R...L...P...A...L...K...E...N...V...K...R...V...M...F...Y...C | |
| 7. T. aestivum Ago1 (Zhensha) | ...TPLSIA...IFL...LLVLS...VLLK...P...SVVCLPAV...PAYAA...LAAF...R...R...F...Y...M...P...D...S...G...S...V...A...S...G...A...R...G...P...P...D...G...P...R...S...T...R...F...G...V...A...V...R...R...L...P...A...L...K...E...N...V...K...R...V...M...F...Y...C | |
| 8. T. aestivum Ago1 (Omskaja 35) | ...TPLSIA...IFL...LLVLS...VLLK...P...SVVCLPAV...PAYAA...LAAF...R...R...F...Y...M...P...D...S...G...S...V...A...S...G...A...R...G...P...P...D...G...P...R...S...T...R...F...G...V...A...V...R...R...L...P...A...L...K...E...N...V...K...R...V...M...F...Y...C | |

Рисунок 10. Выравнивание предположительных аминокислотных последовательностей TaAGO1 в программе MEGA11

Кроме того, выравнивание нуклеотидной последовательности в программе MEGA11 выявило у сорта Жница однонуклеотидную замену (рис. 9), ведущую к замене аминокислоты Пролин на Серин в положении 855 (рис. 10), 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 домена PIWI (497-818). С другой стороны, включающий замену участок данного белка в положении 567-868 был также определен как гомологичный суперсемейству рибонуклеаз H. Поэтому не исключено, что данная замена могла оказать влияние на каталитические свойства этой РНК-нуклеазы и/или ее способность связываться с целевыми фрагментами. Также на платформе MEGA11 были построены филогенетические деревья генов *AGO* и *DCL* у исследуемых сортов по отношению к другим видам растений (Рис. 11). Как видно из рис. 11(а), гены *AGO* из одной и той же группы у разных растительных видов располагались ближе друг к другу на филогенетическом древе, чем к другим генам внутри одного и того же вида. Более того, ген *AGO1* оказывается на отдаленной от *AGO2* и *AGO3* ветви, что соотносится с аналогичными результатами в работах (Ahmed et al., 2021). Сходная картина наблюдалась и на филогенетическом древе генов семейства *DCL* (Рис. 11(б)). 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, 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. На основе имеющихся предположительных аминокислотных последовательностей, при помощи онлайн-ресурса «SWISS-MODEL» (<https://swissmodel.expasy.org>), построены объемные модели белка TaAGO1, соответствующих просеквенированным фрагментам кДНК, показавшие изменения его пространственной организации (рис. 12).

При помощи ресурса «Prot pi» (<https://www.protpi.ch/Calculator/Protein Tool>) был проведен сравнительный анализ белка TaAGO1 и его варианта с заменой аминокислоты у сорта пшеницы Жница по ряду физико-химических показателей (табл. 1). В совокупности с данными об активности транскрипции гена *TaAGO1* у сорта пшеницы Жница (рис. 2), степени поражения данного сорта патогеном (рис. 1), а также роли домена PIWI, можно полагать, что данная аминокислотная замена могла оказывать влияние на степень активности белка TaAGO1 при инфицировании возбудителем септориоза.

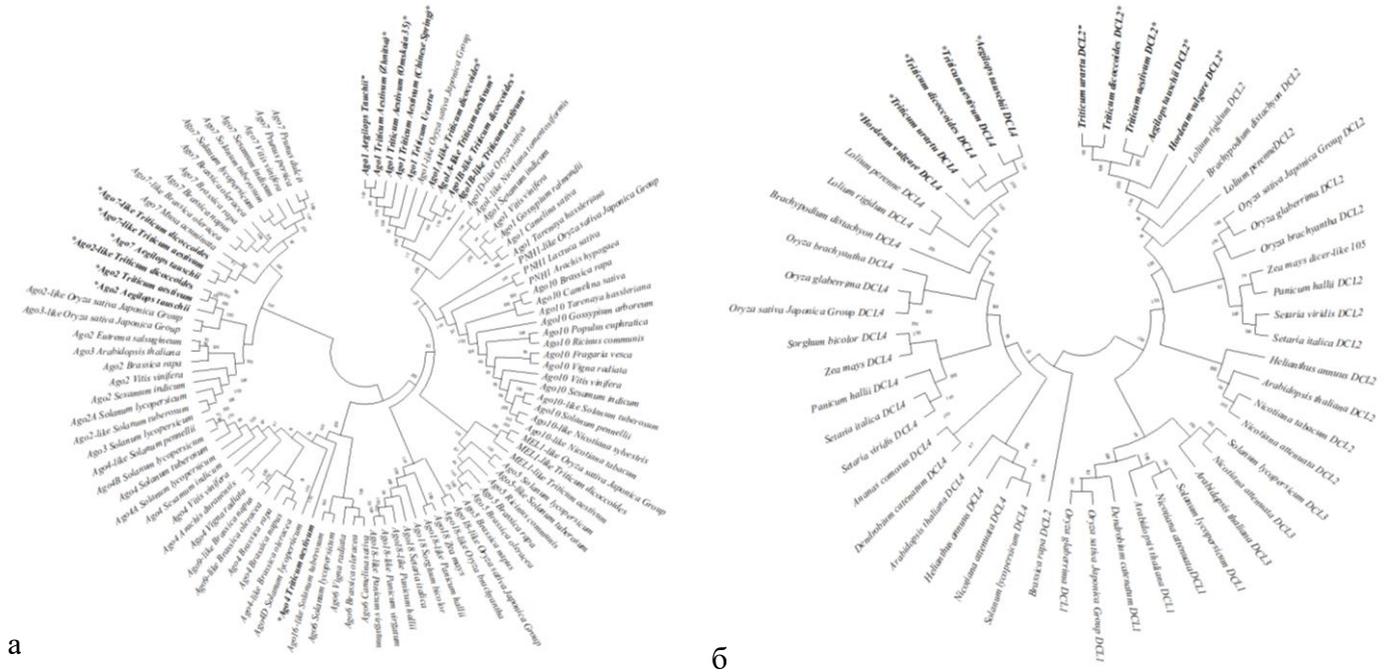


Рисунок 11. Филогенетическое древо генов семейства *AGO* (а) и *DCL* (б) у видов растений

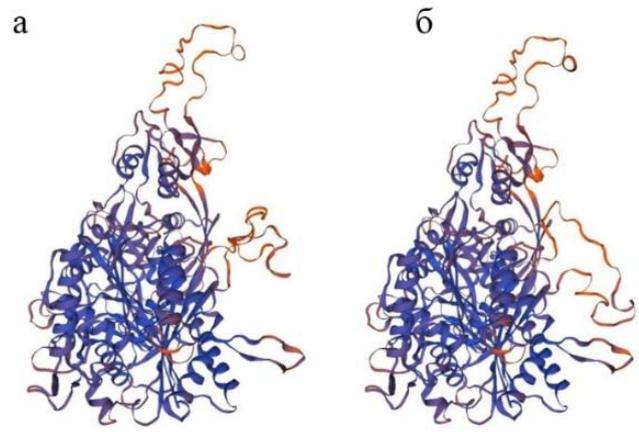


Рисунок 12. Предположительные объемные модели четвертичной структуры белка TaAGO1 (а) и его варианта с заменой аминокислоты Пролин на Серин (б)

Таблица 1. Сравнительная характеристика белка TaAGO1 и его варианта с заменой аминокислоты Пролин на Серин

| Показатель | Оригинальный белок | Замена Pro на Ser |
|--|---|---|
| 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) | $\epsilon_{\lambda=280\text{nm}} = 80'680 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ | |
| | $\epsilon_{\lambda=214\text{nm}} = 1'656'724 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ | $\epsilon_{\lambda=214\text{nm}} = 1'654'083 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ |
| Масса (по абсорбционному коэффициенту) | $\epsilon'_{\lambda=280\text{nm}} = 0.825 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ | |
| | $\epsilon'_{\lambda=214\text{nm}} = 16.94 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ | $\epsilon'_{\lambda=214\text{nm}} = 16.92 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ |

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. 13). Установлено, что при выращивании гриба на питательной среде без СК и ЖК активность гена *SnAGO1* и *SnAGO2* у образцов мицелия гриба возрастала к 7-м сут. При добавлении в питательную среду СК и ЖК наблюдалось выраженное повышение уровня транскриптов всех исследуемых генов *SnAGO* в более ранние сроки, причем степень накопления их транскриптов была прямо-пропорциональна концентрации СК (рис. 13). Особо следует обратить при этом внимание на то, что наиболее чувствительной к добавлению в среду культивирования ЖК оказались гены *SnAGO1* и *SnAGO18*.

Визуально заметного ингибирования роста мицелия грибов в вариантах эксперимента с использованными концентрациями СК и ЖК не наблюдалось. На рис. 14 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.

Активность транскрипции генов системы РНКи у гриба *S. nodorum* в условиях инфицирования растений пшеницы в норме и после предварительной предпосевной обработки семян СК и ЖК. Ранее нам не было известно, как ведут себя гены патогена *SnAGO*, ответственные за формирование РНКи, в условиях инфицирования восприимчивых и устойчивых сортов пшеницы.

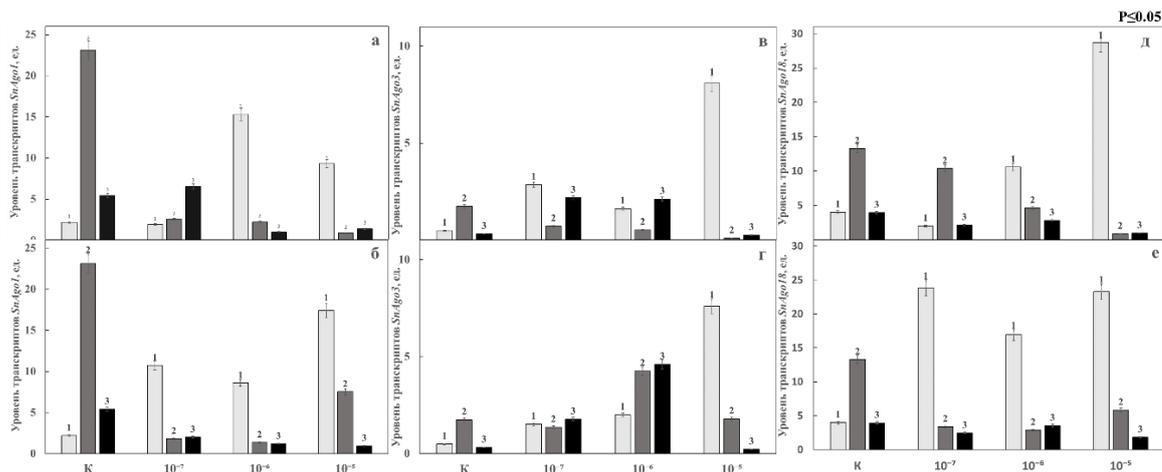


Рисунок 13. Изменения уровня транскриптов генов *SnAGO* у *S. nodorum* на питательной среде с добавлением СК (а, в, д) и ЖК (б, г, е) различной концентрации (М) через 5 (1), 7 (2) и 14 (3) суток после посадки а, б – *SnAGO1*; в, г – *SnAGO3*; д, е – *SnAGO18*

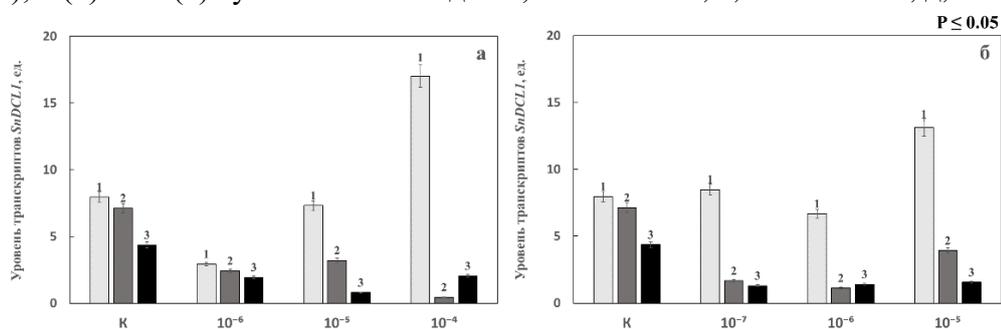


Рисунок 14. Изменения в уровне транскриптов гена *SnDCL1* у *S. nodorum*, на питательной среде с добавлением СК (а) и ЖК (б) различной концентрации (М) через 5 (1), 7 (2) и 14 (3) суток после посадки.

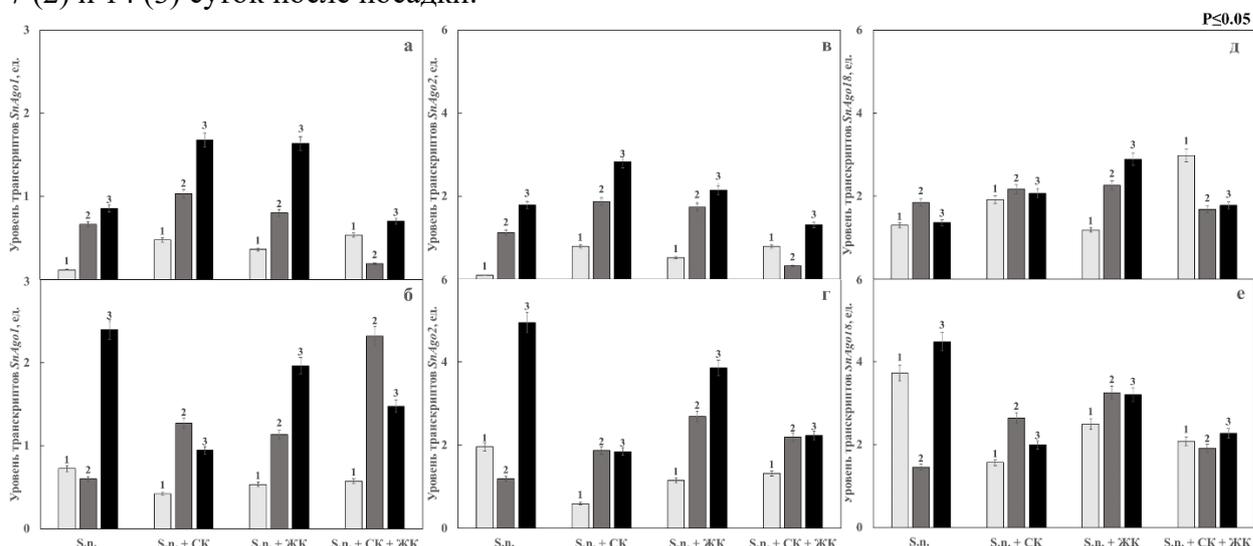


Рисунок 15. Изменение уровня транскриптов генов *SnAGO* у *S. nodorum* при обработке семян растения-хозяина СК и ЖК у сорта Жница (а, в, д, ж) и сорта Омская 35 (б, г, е, з) через 6 (1), 24 (2) и 72 (3) часа после инфицирования: а, б – *SnAGO1*; в, г – *SnAGO2*; д, е – *SnAGO3*; ж, з – *SnAGO18*

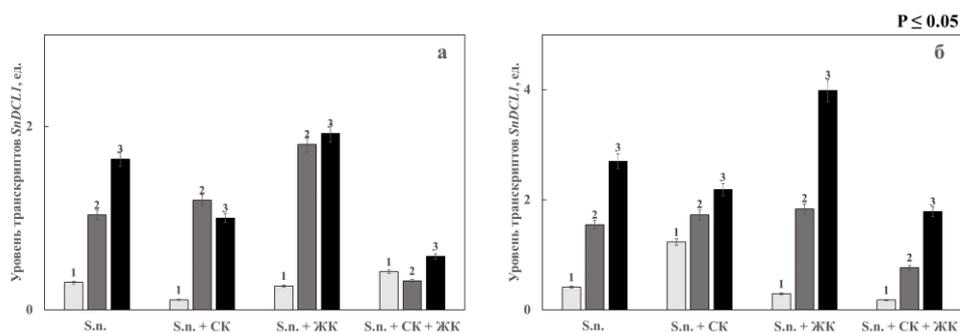


Рисунок 16. Изменение уровня транскриптов гена *SnDCL1* у гриба *S. nodorum* при обработке семян растения-хозяина СК и ЖК у восприимчивого сорта Жница (а) и устойчивого сорта Омская 35 (б) через 6 (1), 24 (2) и 72 (3) часа после инфицирования

Мы провели анализ активности транскрипции ряда генов *S. nodorum* в растениях пшеницы, инфицированных патогеном, в условиях их предобработки СК и ЖК, а также их композицией (рис. 15; рис. 16). Как видно, при инфицировании листьев пшеницы спорами гриба в течение наблюдаемого периода происходит накопление транскриптов генов *SnAGO1*, *SnAGO2* и *SnAGO3*. При этом обращает на себя внимание то, что на 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. 1) и резкое накопление транскриптов генов, ответственных за хозяйскую РНКи, у сорта пшеницы Омская 35 на 24-часовой точке фиксации, можно заключить, что первые 6 часов растения данного сорта эффективно сопротивляются патогену при помощи различных защитных систем. Обработка семян СК и ЖК, а также их композицией, дифференцированно стимулировало последующее накопление транскриптов генов *SnAGO*, в патогенной системе с обоими сортами пшеницы (Рис. 15). При этом, на фоне активного накопления уровня транскриптов были обнаружены различия в экспрессии генов *SnAGO*. Например, гены *SnAGO1* и *SnAGO18* на сорте Омская 35 экспрессировались в 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* 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. Как видно из рис. 16 в патогенной системе уровень транскриптов гена *SnDCL1* в ходе развития септориоза стабильно в течение опыта накапливается в обоих сортах.

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 участия генов *SnAGO* и *SnDCL* патогенного гриба *S. nodorum* в формировании патосистемы с контрастными по устойчивости к септориозу растений мягкой пшеницы сортов Жница и Омская 35, иммунизированных бактериальным штаммом *B. subtilis* 26Д. Как видно из рис. 17, уровень транскриптов генов *SnAGO18* (б) и *SnAGO3* (г) у сорта Жница в норме, без обработки штаммом *B. subtilis* 26Д, была значительно выше, чем аналогичная у 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. В совокупности с данными по интенсивности развития и степени поражения контрастных сортов (рис. 1), а также активности транскрипции генов системы РНКи пшеницы (рис. 6, рис. 7), можно полагать, что это объясняется необходимостью подавлять экспрессионную активность грибных генов, ответственных за РНКи для успешного формирования праймированного бактериями защитного ответа.

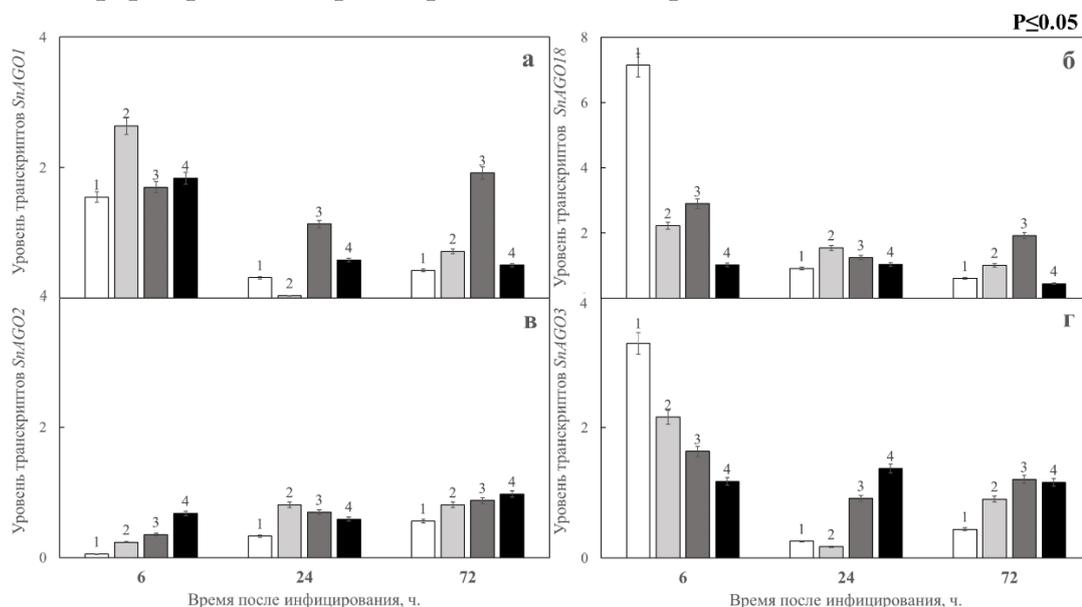


Рисунок 17. Изменение в уровне транскриптов генов *SnAGO1* (а), *SnAGO18* (б), *SnAGO2* (в) и *SnAGO3* (г) системы РНКи у гриба *S. nodorum* при обработке семян пшеницы штаммом *B. subtilis* 26Д: 1 – Жница (инф.); 2 – Омская 35 (инф.); 3 – Жница (инф. + *B. subtilis* 26Д); 4 - Омская 35 (инф. + *B. subtilis* 26Д)

Филогенетический анализ генов *AGO* и *DCL* гриба *S. nodorum*. На рис. 18 представлены результаты анализа генетического расстояния между различными грибными генами *AGO* и гомологичным им генов *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 рис. 18, 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*. Соответственно, по гену *DCL1* гриб *S. nodorum* (рис. 18) выделяется в отдельную ветвь вместе с представителями класса дотидеомицетов (*Dothideomycetes*) а локус SNOG_08521 гена *SnDCL1* имеет большее сродство к аналогичным генам 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).

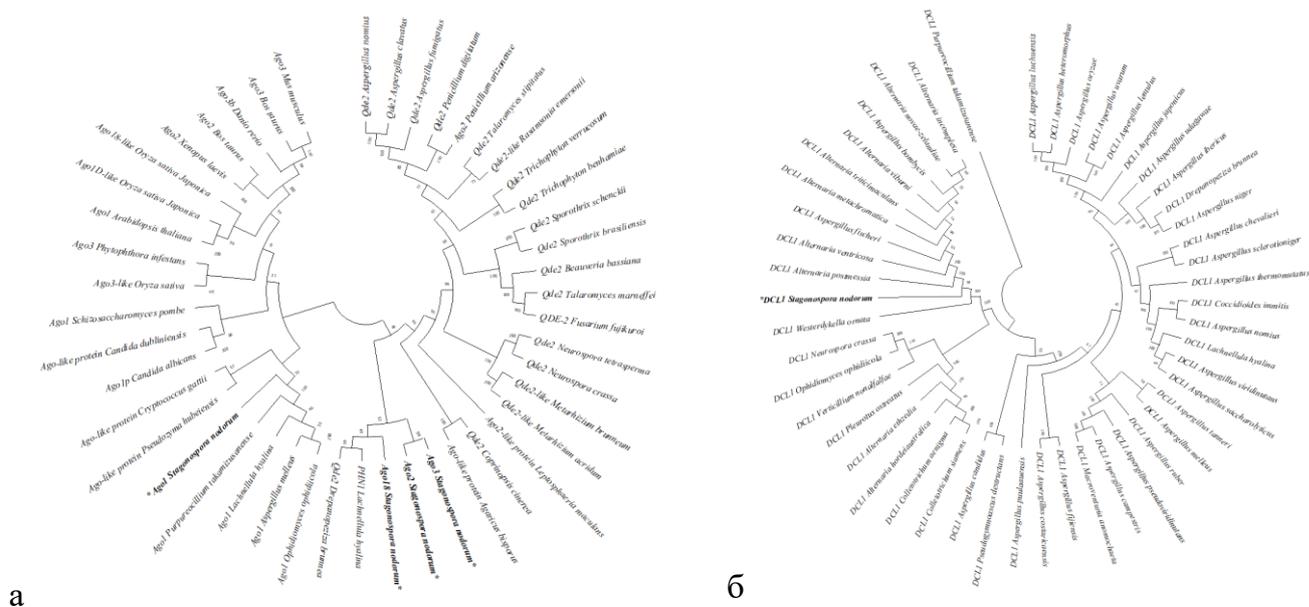


Рисунок 18. Филогенетическое древо генов *AGO* (а) и *DCL* (б) у различных организмов

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ активности транскрипции генов *TaAGO* и *TaDCL* вовлеченных в РНКи у контрастных по устойчивости к септориозу сортов мягкой пшеницы Жница и Омская 35, а также у вирулентного штамма гриба *S. nodorum* *SnB* в норме и в условиях иммунизации растений СК и ЖК, а также спорами эндофитной бактерии *B. subtilis* 26Д обнаружил их активацию у восприимчивого сорта Жница на ранних этапах инфицирования и фоне слабо выраженной активности соответствующих грибных генов. В тоже время, накопление транскриптов генов *SnAGO* и *SnDCL* в тканях листа пшеницы Омская 35, напротив, было более выраженным, что может говорить об их вовлеченности в преодолении защитной системы растения-хозяина, а также непосредственной регуляции активности генов патогена в зависимости от степени устойчивости хозяина. Полученные на контрастных по устойчивости сортах пшеницы данные подтверждены на растениях пшеницы после их иммунизации растворами СК и ЖК, а также суспензией клеток *B. subtilis* 26Д. Секвенирование фрагментов гена *TaAGO1* позволило установить их положение на филогенетическом древе и оценить геномную реализацию процесса РНКи. Было показано, что основной вклад в реализации экспрессии гена *TaAGO1* у мягкой пшеницы вносится копией данного гена, находящейся на хромосоме 7D, что соотносится с данными литературы (Романов и др., 2018). Кроме того, была выявлена межсортовая однонуклеотидная вариабельность в последовательности гена *TaAGO1* у 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 *S. nodorum* 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.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ, ВХОДЯЩИЕ В ПЕРЕЧЕНЬ ВАК МОН РФ

1. Maksimov I.V. 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, A.M. Avalbaev, P.D. Dhaware, G.T. Mehetre, B.P. Singh, R.M. Khairullin // Plants 2019. - V.8. - Art. – P. 575. - DOI: 10.3390/plants8120575. (WoS, SCOPUS, Q1) - (Глава 1.1).

2. Максимов И.В. РНК-интерференция в защитных системах растений / И.В. Максимов, М.Ю. Шеин, Г.Ф. Бурханова // Физиология растений. – 2021. - том 68. - No 4.- с. 356-370. - DOI: 10.31857/S0015330321030131. (РИНЦ, RSCI, ВАК). - Перевод: Maksimov, I.V., Shein, M.Y., Burkhanova, G.F. RNA Interference in Plant Defense Systems. - *Russ. J. Plant Physiol.* 2021. - V. 68. - P. 613–625. - (ВАК, РИНЦ, WoS, SCOPUS, Q3) - (Глава 1.6).

3. 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.- С. 196-200. - DOI: 10.21515/1999-1703-92-196-200. (ВАК, РИНЦ) - (Глава 3.3).

4. Максимов И. В. Эндофиты 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. - № 5 (98). - С. 98-104. DOI: 10.21515/1999-1703-98-98-104. (ВАК, РИНЦ) - (Глава 1.9).

5. 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. - С. 219 – 234. - DOI: 10.31857/S0555109923030133. (РИНЦ, RSCI, ВАК). - Перевод: Maksimov I.V., Shein M.Y., Burkhanova G.F. RNA Interference in Plant Protection from Fungal and Oomycete Infection // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2022. – Т. 58. – №. Suppl 1. – P. S16 - S31. (ВАК, РИНЦ, WoS, SCOPUS, Q4) - (Глава 1).

6. Шеин М.Ю. Влияние салициловой и жасмоновой кислот на активность генов *SnAGO* гриба *Stagonospora nodorum* Berk. в культуре и при инфицировании растений пшеницы / М.Ю. Шеин, Г.Ф. Бурханова, И.В. Максимов // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2023. - Т.27. - №8. - С. 1000-1009; DOI: 10.18699/VJGB-23-115. (ВАК, РИНЦ, WoS, SCOPUS, Q4) - (Глава 3.1., 3.5, 3.6).

ДРУГИЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

7. Shein M. Yu, The role of RNA interference in the formation of protective systems of wheat against the pathogen *Septoria Stagonospora nodorum* Berk. / M. Yu. Shein, I. V. Maksimov, G. F. Burkhanova // FEBS OPEN BIO. – 111 RIVER ST, НОВОКЕН 07030-5774. NJ USA: WILEY. - 2021. – V. 11. – P. 123. - (Глава 3.2).

8. Максимов И.В. Эндофитные 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. - DOI:10.28983/PLAMIC2020.222. - (Глава 1.9).

9. 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 // Мат. 2-ой Межд. научной конф. PLAMIC2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» 5-9 октября 2020 г, Саратов / отв. Ред. И. А. Тихонович. – 2020. – С. 222. - DOI: 10.28983/PLAMIC2020.222. - (Глава 3.3).

10. Шеин М.Ю. Изменение транскрипционной активности генов системы РНК-интерференции гриба *Stagonospora nodorum* Berk в патогенной системе в условиях индуцирования фитоиммунитета / М.Ю. Шеин, Г.Ф. Бурханова, И.В. Максимов // 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. - (Глава 3.6).

11. Шеин М.Ю. Влияние салициловой и жасмоновой кислот на транскрипционную активность генов *TADCL2* и *TADCL4* в растениях пшеницы при инфицировании грибом *Stagonospora nodorum* / М.Ю. Шеин, Г.Ф. Бурханова, И.В. Максимов // ЭкоБиоТех 2021. – 2021. – С. 172-175. - (Глава 3.2).

12. 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. - С. 115-117. - (Заключение).

13. Шеин М.Ю. Изменения активности генов *DCL* и *AGO* в растениях пшеницы инфицированных *Stagonospora nodorum* BERK и при обработке бактериями *Bacillus* 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. - 2020 г. - С. 96-97. - (Глава 3.3).

14. Шеин М. Ю. Роль РНК-интерференции в формировании защитных систем растения пшеницы (*Triticum*) / М. Ю. Шеин, Г. Ф. Бурханова, И. В. Максимов // IX Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений - основа создания растений будущего». – 2019. – С. 478. - DOI: 10.26907/978-5-00130-204-9-2019-478. - (Глава 3.3).

15. Шеин М.Ю. Влияние инфицирования грибом *Stagonospora nodorum* на транскрипционную активность гена *Ago1* в растениях пшеницы / М.Ю. Шеин, А.Ю. Мерзлякова, Г.Ф. Бурханова, И.В. Максимов // Сборник статей Межд. научно-практической конф. World science: Problem and innovations. - г. Пенза. - 2021. - С. 62-65. - (Глава 3.3).

16. Shein M.Yu. The bacterial impact on the transcriptional activity of *DCL2* and *DCL4* genes in wheat plants infected with *Stagonospora nodorum* / M.Yu. Shein, G.F. Burkhanova, I.V. Maksimov // Abstracts of the 6th int. Sci. Conf. “Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology” (PlantGene2021). – Novosibirsk. – 2021. - P. 201. - DOI: 10.18699/PlantGen2021-006. - (Глава 3.3).

17. Shein M.Yu. The impact of salicylic and jasmonic acids on *SnDCL1* gene activity of pathogenic fungus *Stagonospora nodorum* in culture *in vitro* and during infection of wheat plants / M.Yu. Shein, G.F. Burkhanova, I.V. Maksimov // Abstracts of the 7th International Sci. Conf. “Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology” (PlantGen2023). – Kazan'. - 2023. – P. 363 - (Глава 3.1, 3.3).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

РНКи – РНК-интерференция (RNAi – RNA interference); СК – салициловая кислота; ЖК – жасмоновая кислота; *S.n./Sn* – *Stagonospora nodorum*.