Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023;27(8):1000-1009
DOI 10.18699/VJGB-23-115

Перевод на английский язык https://vavilov.elpub.ru/jour

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 ✉

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия
✉ igor.mak2011@yandex.ru

Аннотация. РНК-интерференция представляет собой механизм подавления генов, играющий важную роль в генетической регуляции у эукариот. Белки Argonaute (AGO) занимают центральное место в сложной системе явления РНК-интерференции. Однако их роль в этом механизме, как в организме растения-хозяина, так и у патогена, до сих пор полностью не исследована. Мы провели идентификацию и филогенетический анализ генов *SnAGO1*, *SnAGO2*, *SnAGO3* и *SnAGO18* патогенного гриба *Stagonospora nodorum* Berk., возбудителя септориоза пшеницы, и проанализировали их экспрессию в условиях инфицирования растений с различной степенью устойчивости к патогену. Уровень экспрессии оценивали на фоне иммунизации растений индукторами устойчивости: салициловой и жасмоновой кислотами. Также изучена активность указанных генов в культуре гриба при непосредственном воздействии индукторов устойчивости на мицелий гриба. Выявленная более ранняя активация генов *SnAGO* в культуре под влиянием салициловой и жасмоновой кислот указывает на их чувствительность к ним. В системе *in vivo* обнаружено, что иммунизация растений индуцирует накопление транскриптов *SnAGO* патогена. При этом гены *SnAGO* гриба *S. nodorum* при взаимодействии с растительными клетками реагировали в зависимости от степени устойчивости хозяина: наиболее высокий уровень транскриптов наблюдался в устойчивом сорте. Таким образом, полученные данные доказывают, что гены *SnAGO* гриба *S. nodorum* эффективно взаимодействуют с системой защиты хозяина в прямой зависимости от степени устойчивости последнего к патогену. Предложено использовать отношение транскрипционной активности грибного референсного гена *SnTub* к хозяйскому гену *TaRLI* в качестве маркера развития болезни в начальный период инфекционного процесса.
Ключевые слова: РНК-интерференция; гены *SnAGO*; гриб *Stagonospora nodorum*; мягкая пшеница; патогенез; салициловая кислота; жасмоновая кислота.

Для цитирования: Шеин М.Ю., Бурханова Г.Ф., Максимов И.В. Влияние салициловой и жасмоновой кислот на активность генов *SnAGO* гриба *Stagonospora nodorum* Berk. в культуре и при инфицировании растений пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(8):1000-1009. DOI 10.18699/VJGB-23-115

The effect of salicylic and jasmonic acids on the activity of *SnAGO* genes in the fungus *Stagonospora nodorum* Berk. in *in vitro* culture and during infection of wheat plants

M.Yu. Shein, G.F. Burkhanova, I.V. Maksimov ✉

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia
✉ igor.mak2011@yandex.ru

Abstract. RNA interference is a gene silencing mechanism that plays an important role in genetic regulation in a number of eukaryotes. Argonaute (AGO) proteins are central to the complex RNA interference system. However, their role in this mechanism, both in the host plant organism and in the pathogen, has not yet been fully elucidated. In this work, we identified and phylogenetically analyzed the *SnAGO1*, *SnAGO2*, *SnAGO3*, and *SnAGO18* genes of the pathogenic fungus *Stagonospora nodorum* Berk., and analyzed their expression under conditions of infection of plants with varying degrees of resistance to the pathogen. The expression level against the background of plant immunization with the resistance inducers salicylic and jasmonic acids was assessed. In addition, the activity of these genes in the culture of the fungus *in vitro* was studied under the direct influence of resistance inducers on the mycelium of the fungus. Earlier activation of the *SnAGO* genes in *in vitro* culture under the influence of salicylic and jasmonic acids suggests their sensitivity to it. In an *in vivo* system, plant immunization to induce the accumulation of pathogen *SnAGO* transcripts was found. At the same time, the *SnAGO* genes of the fungus *S. nodorum*, when interacting with plant cells, reacted depending on the degree of host resistance: the highest level of transcripts in the resistant variety was observed. Thus, our data prove that the *SnAGO* genes of the fungus *S. nodorum* effectively

© Шеин М.Ю., Бурханова Г.Ф., Максимов И.В., 2023
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

interact with the host defense system in direct proportion to the degree of resistance of the latter to the pathogen. It was proposed to use the ratio of the transcriptional activity of the fungal reference gene *SnTub* to the host *TaRLI* gene as a marker of disease development in the initial period of the infectious process.
Key words: RNA interference; *SnAGO* genes; fungus *Stagonospora nodorum*; common wheat; pathogenesis, salicylic acid; jasmonic acid.

For citation: Shein M.Yu., Burkhanova G.F., Maksimov I.V. The effect of salicylic and jasmonic acids on the activity of *SnAGO* genes in the fungus *Stagonospora nodorum* Berk. in *in vitro* culture and during infection of wheat plants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(8):1000-1009. DOI 10.18699/VJGB-23-115

Введение

Фитопатогенные грибы представляют огромную угрозу продовольственной безопасности, ограничивая биологический потенциал сельскохозяйственных растений и снижая качество получаемой продукции. На современном этапе разрабатываются методы защиты растений, основанные на естественном системном и клеточном фитоиммунитете, при котором особое место занимает уникальный механизм отключения экспрессии генов, описываемый термином «РНК-интерференция» (РНК-и) – эволюционно консервативный и в то же время высокоспецифичный иммунный компонент практически всех эукариот.

При создании современных подходов к защите растений необходимо учитывать, что при взаимодействии растений с патогенами, в особенности грибной природы, активируются компоненты РНК-и не только хозяина, но и патогена. Индукция активности ряда генов, ответственных за функционирование РНК-и у патогенных грибов, предполагает возможность их участия в супрессии генов фитоиммунной системы хозяина (Weiberg et al., 2013). Стоит отметить, что роль механизма РНК-и в эволюции и жизнедеятельности грибов важна и может значительно различаться в зависимости от стратегии выживания, способа инфицирования и распространения, а также от патогенов, поражающих сам гриб (Neupane et al., 2019). Например, при искусственном отключении одного или двух генов, кодирующих белки РНК-и, у фитопатогенных грибов нарушается вирулентность (Raman et al., 2017; Wang et al., 2018).

Белки Argonaute (AGO) связывают короткие микроРНК и считаются ключевыми в комплексе явления РНК-и (Feng et al., 2017; Neupane et al., 2019). Наиболее важная функция белков AGO, активно обсуждаемая в научной литературе, это участие в фитоиммунитете. Например, ранее мы наблюдали, что предварительная обработка семян салициловой кислотой (СК) формировала устойчивость пшеницы к септориозу, при этом в тканях растений, инфицированных возбудителем этой болезни, отмечено активное накопление транскриптов гена *TaAGO1* (Шеин и др., 2021). У растений табака *Nicotiana attenuata* Torr. ex S.Watson накопление белка NaAGO4 оказалось критичным при формировании устойчивости к грибу *Fusarium brachygibbosum* Padwick (1945) по жасмонатному сигнальному пути (Pradhan et al., 2020). Нарушение этого процесса отключало синтез жасмоновой кислоты (ЖК) в растениях и приводило к их инфицированию, но устойчивость к грибу восстанавливалась после обработки растений ЖК. Можно полагать, что функционирование защитной системы растений, регулируемое ЖК, опосредует работу механизма явления РНК-и. Обнаружена важность растительных белков AGO18 в процессе формирования противовирусной защиты риса (Yang et al., 2020).

Также известно, что белки AGO активно задействованы в физиологических процессах, происходящих в мицелии различных видов грибов. Так, гены, кодирующие белки AGO, были идентифицированы в геноме грибов *Fusarium graminearum* (*FgAGO1*) (Chen et al., 2015) и *Metarhizium robertsii* (*MrAGO1*) (Meng et al., 2017). На примере грибов *Verticillium dahliae* и *V. longisporum* показано участие грибных белков семейства AGO в формировании совместимости между хозяином и патогеном (Shen et al., 2014). Аналогичный эффект наблюдался у гриба *Scletotinia sclerotiorum:* мутанты по гену *AGO2* этого гриба имели замедленный рост и пониженную вирулентность (Neupane et al., 2019). Подавление экспрессии гена *AGO2* (*QDE-2*) также снижало вирулентность у грибов *Valsa mali* (Feng et al., 2017) и *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Jo et al., 2018).

Таким образом, белки семейства AGO являются ключевыми компонентами в работе не только растительной, но и грибной защитной системы, опосредованной механизмами РНК-и. Вместе с тем следует отметить, что до сих пор мало работ посвящено анализу экспрессии генов, кодирующих белки механизма РНК-и у различных патогенов, в условиях инфицирования растений и предварительной иммунизации фитогормонами СК и ЖК. В данной работе такой анализ проведен на модели фитопатогенного гриба *Stagonospora nodorum* Berk. (син. *Septoria*, *Parastagonospora*, *Phaeosphaeria*), вызывающего септориоз у мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. Основная задача заключалась в том, чтобы оценить изменения в транскрипционной активности генов *SNAGO*, кодирующих белки AGO, в культуре гриба *in vitro* и в условиях инфицирования этим грибом растений, контрастных по устойчивости к септориозу на фоне обработки СК и ЖК.

Материалы и методы

Объект исследования. В эксперименте использовали высоковирулентный в отношении мягкой пшеницы *T. aestivum* (сорт Жница) штамм фитопатогенного гриба *S. nodorum* SnB из коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН. В качестве растительного материала применяли контрастные по устойчивости сорта *T. aestivum* (BAD, 2*n* = 42): Жница (восприимчивый) и Омская 35 (устойчивый).

Культивирование гриба *in vitro*. Гриб культивировали на жидкой картофельно-глюкозной питательной среде в чашках Петри. Для этого в питательную среду вносили

суспензию спор гриба из расчета 10^5 спор/мл и культивировали в климатокамере KBW E6 (Binder GmbH, Германия) при температуре 18 °C в течение 14 сут при периодическом 16-часовом освещении. В экспериментальные варианты питательных сред предварительно добавляли растворы СК с концентрациями 10^{-4}, 10^{-5} и 10^{-6} М, а также ЖК – 10^{-5}, 10^{-6} и 10^{-7} М. Эти концентрации были выбраны как оптимальные в связи с полученными ранее в нашей лаборатории данными о влиянии СК и ЖК на степень развития септориоза у различных сортов пшеницы в патосистеме (Яруллина и др., 2011).

Постановка эксперимента. Семена пшеницы предварительно вымачивали в течение 24 ч в растворах, содержащих 10^{-5} М СК и 10^{-7} М ЖК или их композицию. Контрольные варианты в течение этого же времени выдерживали в дистиллированной воде. Затем проростки в изолированных сосудах на питательной среде Хогланда–Арнона помещали в климатостат KBW E6 (Binder GmbH, Германия) с 16-часовым световым периодом при температуре 20/24 °C (ночь/день). Отмеченные концентрации фитогормонов выбраны в результате предварительных экспериментов как наиболее эффективные в индуцировании устойчивости растений пшеницы против *S. nodorum* (Яруллина и др., 2011). Затем отрезки листьев 7-суточных контрольных и экспериментальных проростков пшеницы помещали в чашки Петри на влажную вату с добавлением бензимидазола (40 мг/л). Часть листьев инфицировали спорами гриба путем нанесения 4 мкл суспензии (10^5 спор/мл), согласно методике (Veselova et al., 2021). Инокулированные спорами гриба листья в чашках Петри помещали на 24 ч в термостат, затем переносили в климатостат KBW E6 (Binder GmbH, Германия).

Визуальная оценка степени развития гриба на листьях пшеницы. За развитием гриба *S. nodorum* на листьях наблюдали ежедневно. Площадь под кривой развития болезни в вариантах определяли согласно методике, предложенной А.А. Марченковой с коллегами (1991). Площадь зоны поражения листьев измеряли с помощью программы ImageJ (https://imagej.nih.gov/ij/download.html).

Выделение РНК, анализ транскрипции генов *SnAGO*. Выделение тотальной РНК из листьев пшеницы, зафиксированных в жидком азоте, а также выращенного *in vitro* мицелия гриба *S. nodorum* SnB проводили с использованием реагента «Лира» согласно протоколу «Биолабмикс» (Россия, https://biolabmix.ru). Концентрацию нуклеиновых кислот измеряли на спектрофотометре (ND1000WOC) Thermo Scientific™ NanoDrop™ 1000 при A_{260}/A_{280}. Для синтеза кДНК выполняли реакцию обратной транскрипции с использованием M-MuLV обратной транскриптазы («Синтол», Россия). Нуклеотидные последовательности исследуемых генов *SnAGO* гриба *S. nodorum* были отобраны из базы данных FunRNA (http://funrna.riceblast.snu.ac.kr/, 12.04.2023). Праймеры к этим генам сконструированы с использованием онлайн-программ Primer-Blast (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast, 12.04.2023) и PrimerQuest Tool (https://eu.idtdna.com/Primerquest, 12.04.2023) (таблица). Для оценки уровня транскрипции генов использовали метод количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad, США). В качестве интеркалирующего красителя применяли реактив SYBR Blue («Синтол», Россия). Активность транскрипции грибного патогена оценивали относительно референсного гена *SnTUB*, кодирующего белок тубулина гриба (Fraaije et al., 2002). Для оценки развития гриба на уровне РНК использовали анализ соотношения транскриптов референсных генов: патогена *SnTub* (Fraaije et al., 2002) и хозяина *TaRLI*, кодирующего белок, подобный ингибитору РНКазы L пшеницы (RNase L inhibitor-like protein) (Giménez et al., 2011) в экспериментальных растениях. Согласно работам приведенных авторов, экспрессия отмеченных генов гриба *S. nodorum* и пшеницы не подвержена воздействию средовых факторов.

Биоинформационный и статистический анализы. Эксперименты проводили в трехкратной повторности. Средние значения со стандартными ошибками (±SE) приведены на рисунках. Статистический анализ полученных данных выполнен в программе Bio-Rad CFX Maestro 1.1 Version: 4.1.2433.1219 (Bio-Rad, США). Различия в исследуемых параметрах между отдельными обработками анализировали с использованием дисперсионного анализа. Выравнивание нуклеотидных последовательностей и построение филогенетического дерева проведены в программе MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11.0.13 (Tamura et al., 2021). Для выравнивания применяли алгоритм MUSCLE, филогенетические древа были построены при помощи метода максимального правдоподобия (maximum likelihood estimation) (Tamura et al., 2021).

Праймеры к генам *SnAGO* гриба *S. nodorum*

Обозначение гена	Нуклеотидная последовательность
Гомолог *SnAGO1 QDE-2*	F GCAAGTTCGCCATGAACAATAA
	R CAAACCTTCTGGACCATCTCTC
SnAGO2	F GGAGACTCACAGTTCGAAGAAG
	R TAGGAGAGGCAGAGGTTGTAA
SnAGO3	F CGTTTCCTGGGTTGACATAGAT
	R GCCAGACGTTCACTCTGATATT
SnAGO18	F GTCAGTCGATCAAGGTGGATTTA
	R CGTATAGTGCTGACGTCTCTTG
SnTub(β)	F TGGTATGGGTACGCTTTTGATCTC
	R GTAGCGACCGTTGCGGAAGTCAGA
TaRLI(a)	F TTGAGCAACTCATGGACCAG
	R GCTTTCCAAGGCACAAACAT

Результаты

На основе ранее проведенных исследований нами подобраны сорта мягкой пшеницы, контрастные по устойчивости к грибу *S. nodorum* (Veselova et al., 2021). Ранее также проведена оценка влияния обработки семян пшеницы СК и ЖК на последующее формирование у проростков

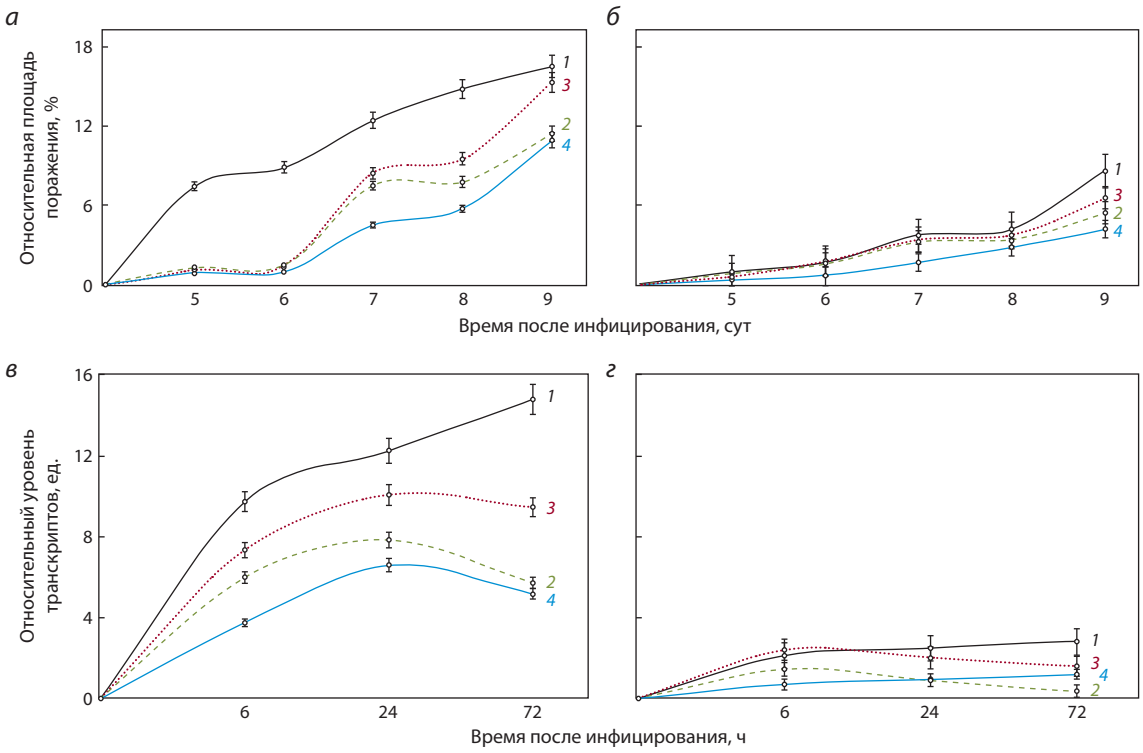

Рис. 1. Изменение площади поражения листа (*а, б*) и уровня транскриптов грибного референсного гена *SnTub* в сравнении с пшеничным геном *TaRLI* (*в, г*) в листьях восприимчивого (*а, в*) и устойчивого (*б, г*) сортов мягкой пшеницы в норме (*1*) и после предварительной обработки салициловой (*2*), жасмоновой (*3*) кислотами и их композицией (*4*).

устойчивости к грибу *S. nodorum* (Яруллина и др., 2011). Результаты этих работ показали, что СК и ЖК позволяют значительно снизить тяжесть развития септориоза у пшеницы.

В данной работе на первом этапе проанализирована степень развития гриба в тканях листа растений в норме и в условиях индуцирования защитной системы растений с использованием СК и ЖК. Интенсивность формирования инфекционного пятна и быстрое развитие некрозов в листьях восприимчивого сорта Жница показали высокую степень поражаемости этого сорта использованным нами штаммом патогена (рис. 1, *а*). У восприимчивого сорта симптомы болезни стали проявляться в виде бурых пятен уже на 4-е сут после инокуляции листьев, а на 7-е сут после инфицирования листья были поражены в значительной степени. В тех же условиях на устойчивом сорте Омская 35 септориоз развивался менее интенсивно (см. рис. 1, *б, г*). Соответственно, в ходе эксперимента подтверждены характерные для исследуемых сортов особенности по признаку устойчивости к грибу *S. nodorum.* В варианте предобработки семян СК и ЖК, как ранее и было обнаружено (Яруллина и др., 2011), наблюдалось торможение развития септориоза на инфицированных грибом листьях, что предполагает системный иммунизирующий эффект этих соединений. Наибольший защитный эффект выявлен в варианте предпосевной обработки семян пшеницы композицией СК и ЖК.

Очевидно, что успешное развитие гриба *S. nodorum* в тканях растений сопровождается накоплением его биомассы и, соответственно, изменением в соотношении белков и нуклеиновых кислот между хозяином и патогеном. Исходя из этого мы провели анализ соотношения уровня транскриптов референсных генов – патогена *SnTub* и хозяина *TaRLI* – в экспериментальных растениях. Как видно из полученных данных (см. рис. 1, *в, г*), соотношение кДНК гена *SnTub* к гену *TaRLI* у восприимчивого сорта Жница в течение наблюдаемого периода было намного выше, чем у устойчивого. Это соотношение резко снижалось у растений, предварительно обработанных СК и ЖК, а также их композицией (наиболее заметно после обработки семян СК+ЖК).

У устойчивого сорта наиболее выраженное снижение соотношения *SnTub/TaRLI* наблюдалось после обработки СК. Эти данные свидетельствуют о важном вкладе салицилат-индуцируемого пути формирования устойчивости растений пшеницы к возбудителю септориоза. Соответственно, можно говорить о том, что показатель *SnTub*/*TaRLI* является удобным маркером для ранней экспресс-диагностики устойчивости растений пшеницы к патогенному грибу *S. nodorum*, а также для оценки изменений этой устойчивости на разных этапах формирования взаимоотношений между растением-хозяином и указанным патогеном.

Для идентификации генов *SnAGO*, кодирующих в геноме *S. nodorum* белки семейства AGO, проведен анализ базы данных FunRNA (Choi et al., 2014) по аннотированной последовательности генома *S. nodorum* (Hane et al., 2007). Этот подход позволил определить локус SNOG_12157. Филогенетическое древо генов *AGO* представлено на рисунке 2. Структура одних и тех же генов

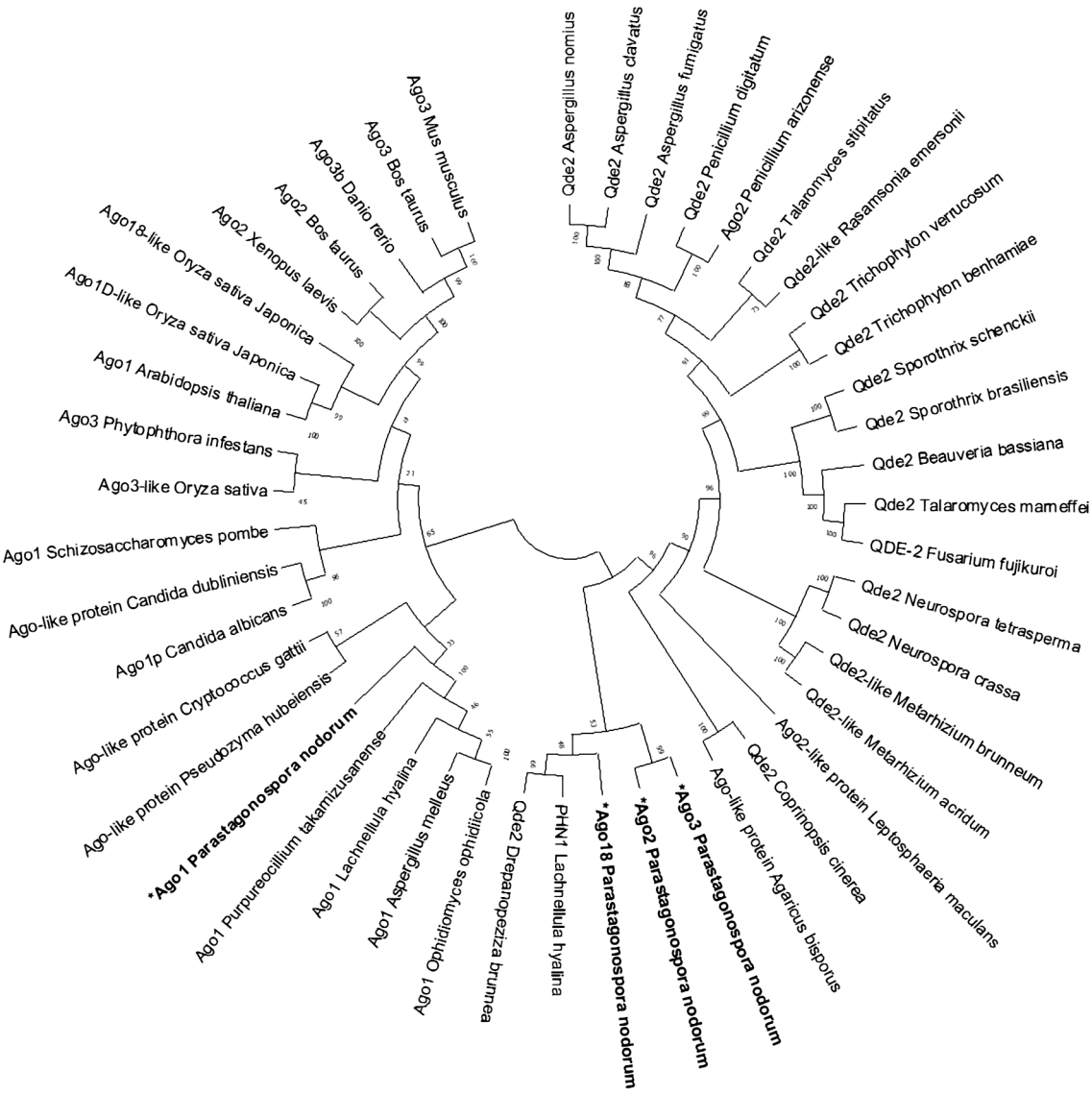

Рис. 2. Филогенетическое древо генов *AGO* и *QDE* у различных организмов. Жирным шрифтом выделены последовательности гриба, изученного в данной работе.

AGO у различных организмов имеет большую гомологию, чем структура различных генов данного семейства у представителей одного и того же рода/таксона. Так, отобранный для анализа ген *AGO1* у возбудителя септориоза *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. Примечательно, что гены *Qde2*, будучи гомологами *AGO1* (Jo et al., 2018), расположены на совсем другой филогенетической ветви грибных генов. Подобное выделение *AGO1* в отдельную от *AGO2* и *AGO3* группу соотносится с аналогичными результатами, полученными в других работах (Zhang et al., 2015; Ahmed et al., 2021).

Последующий BlastP-анализ последовательности позволил выявить множество генов, предположительно кодирующих *SnAGO* грибов, на основании совпадений с известными мотивами, характерными для генов *AGO*. С учетом этого гены *SnAGO* были названы *SnAGO1*, *SnAGO2*, *SnAGO3* и *SnAGO18* соответственно и выбраны для дальнейшего анализа транскрипционной активности. Праймеры для оценки экспрессии генов *SnAGO1*, *SnAGO2*, *SnAGO3* и *SnAGO18* представлены в таблице.

Ранее не было известно, как меняется транскрипционная активность генов гриба, ответственных за формирование явления РНК-и, в условиях инфицирования восприимчивых и устойчивых сортов пшеницы. Для этого мы провели анализ уровня транскриптов генов *SnAGO*, идентифицированных у гриба *S. nodorum*, в условиях инфекции у контрастных по устойчивости к данному патогену сортов мягкой пшеницы, предобработанных СК и ЖК, а также композитом (рис. 3). Так, при инфицировании листьев пшеницы спорами гриба в течение эксперимента происходило накопление транскриптов генов *SnAGO1*, *SnAGO2* и *SnAGO3*. Обращает на себя внимание, что на устойчивом сорте Омская 35 уровень транскриптов генов становился выше в течение эксперимента.

Обработка семян СК и ЖК, а также их композицией сопровождалась локус-специфичным изменением уровня

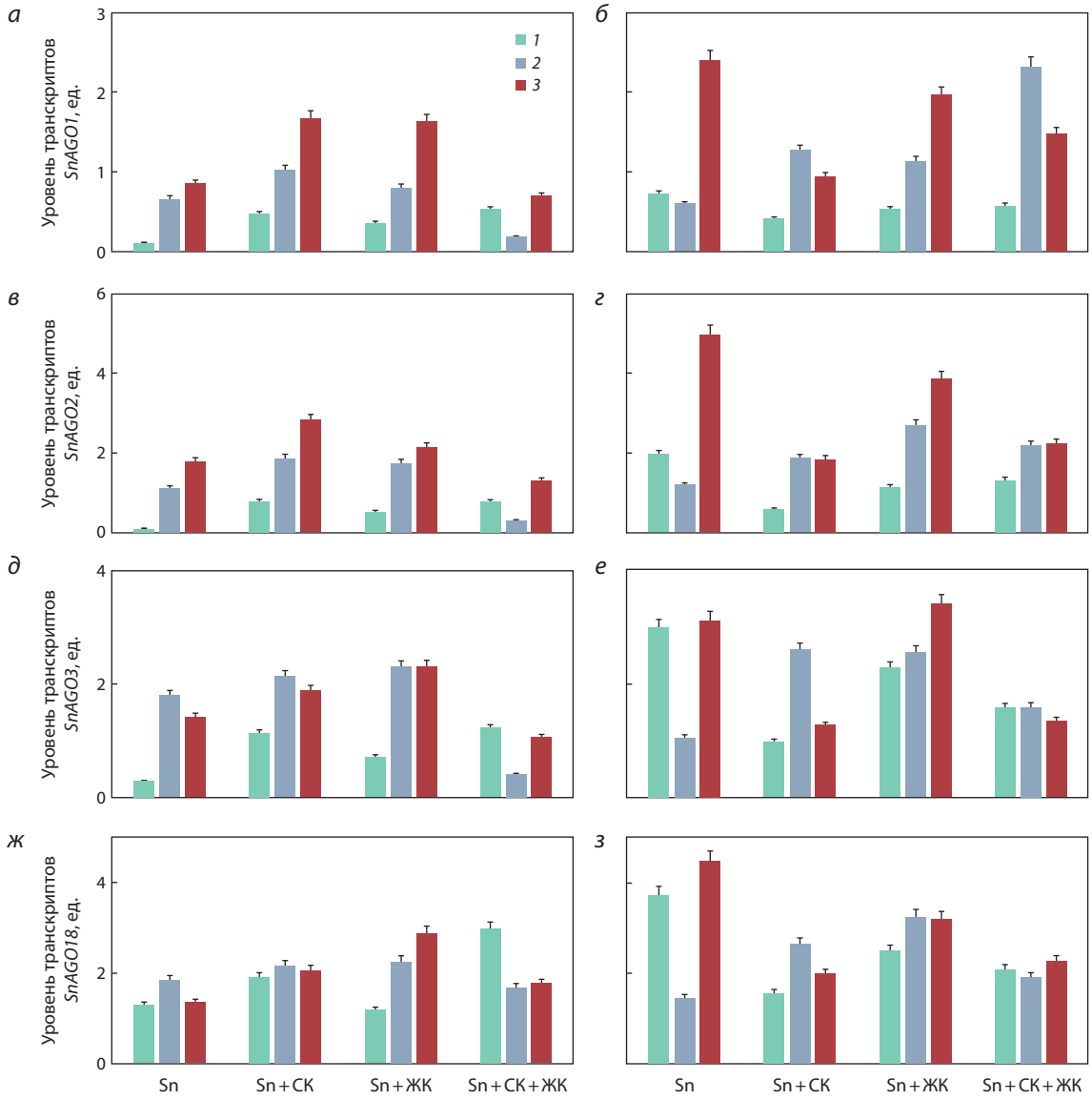

Рис. 3. Изменение уровня транскриптов генов семейства *AGO* гриба *S. nodorum* в листьях восприимчивого (Жница) (*а, в, д, ж*) и устойчивого (Омская 35) (*б, г, е, з*) сортов пшеницы, выросших из обработанных салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислотами семян, через 6 (*1*), 24 (*2*) и 72 (*3*) ч после инфицирования.

а, б – SnAGO1 (Snog_12157); *в, г – SnAGO2* (Snog_10544); *д, е – SnAGO3* (Snog_10546); *ж, з – SnAGO18* (Snog_12309).

транскриптов грибных генов *SnAGO* в патогенной системе как с устойчивым, так и восприимчивым сортами пшеницы (см. рис. 3). Большинство локусов демонстрировали накопление транскриптов, однако его степень различалась в зависимости от локуса и вида обработки. Например, гены *SnAGO1*, *SnAGO2* и *SnAGO18* на устойчивом сорте Омская 35 экспрессировались в большей степени в результате обработки семян ЖК, нежели под влиянием СК. Композиция СК и ЖК снижала активность генов *SnAGO2* и *SnAGO3* более выраженно в сравнении с необработанными и инфицированными образцами.

В инфицированных грибом тканях листа устойчивого сорта, предобработанных как СК, ЖК, так и их композицией, уровень транскрипции всех изученных генов через 24 ч эксперимента (в большей степени *SnAGO1*) был выше по сравнению с необработанными растениями после такого же времени инфицирования, но спустя 72 ч он был ниже соответствующих уровней у необработанных растений (исключение – *SnAGO3* после обработки ЖК). В восприимчивых растениях на протяжении всего эксперимента примерно в равной степени повышалась экспрессия генов *SnAGO1* и *SnAGO3* под влиянием как СК, так и ЖК, в наибольшей степени увеличивалась экспрессия генов *SnAGO2* под влиянием СК и *SnAGO18* под влиянием ЖК по сравнению с контрольными инфицированными растениями. При совместной обработке СК и ЖК семян пшеницы уровень экспрессии всех генов *SnAGO* у восприимчивого сорта повышался через 6 ч инфицирования (в 3 раза в случае с *SnAGO18*).

Таким образом, полученные результаты показывают, что гены *SnAGO*, кодирующие один из ключевых ферментов механизма РНК-и, в грибных клетках при взаимодей-

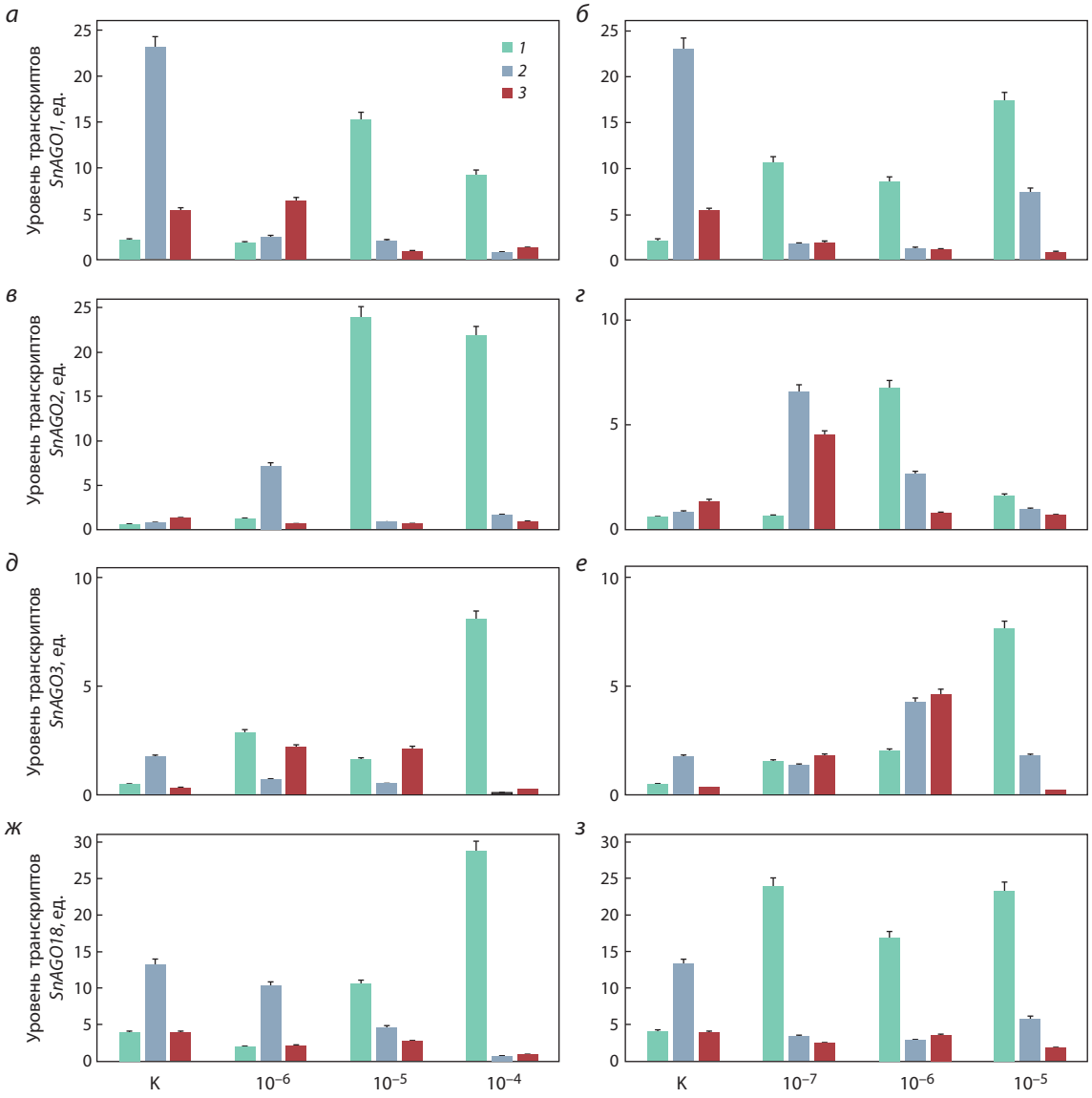

Рис. 4. Изменение уровня транскриптов генов *SnAGO* гриба *S. nodorum,* выращенного на жидкой питательной среде с добавлением салициловой (*а*, *в*, *д*, *ж*) и жасмоновой (*б*, *г*, *е*, *з*) кислот различной концентрации (М), через 5 (*1*), 7 (*2*) и 14 (*3*) сут после посадки.

а, *б* – *SnAGO1* (Snog_12157); *в*, *г* – *SnAGO2* (Snog_10544); *д*, *е* – *SnAGO3* (Snog_10546); *ж*, *з* – *SnAGO18* (Snog_12309).

ствии с растительными клетками реагируют на степень устойчивости хозяина и повышают в устойчивых сортах транскрипционную активность. Соответственно, более высокий уровень транскриптов *SnAGO* в инфицированных патогеном листьях пшеницы подтверждает ранее выдвинутые предположения о важной роли этой группы белков в формировании совместимых взаимоотношений между пшеницей и грибом *S. nodorum* (Shen et al., 2014).

Интерес, на наш взгляд, представляет оценка непосредственного ответа генома гриба на воздействие СК и ЖК в культуре. Так, с использованием выращенного в жидкой культуре мицелия гриба *S. nodorum* оценен экспрессионный статус генов *SnAGO* при добавлении растворов СК и ЖК различной концентрации на 5, 7 и 14-е сут после посадки на среду (рис. 4). Установлено, что при культивировании гриба на питательной среде активность гена *SnAGO1* у контрольных образцов возрастала на 7-е сут после начала культивирования. Активность гена *SnAGO2* в контрольных колониях гриба возрастала в течение эксперимента, но менее выраженно. При добавлении в питательную среду СК наблюдалось значительное повышение уровня транскриптов всех исследуемых генов *SnAGO* уже на 5-е сут, причем степень накопления транскриптов этих генов была прямо пропорциональна концентрации добавляемого вещества. Аналогичные данные получены при добавлении в среду ЖК. При этом добавление сигнальных молекул при всех концентрациях ЖК и относительно высоких концентрациях СК сдвигает накопление транскриптов на самый ранний срок – 5 сут. Особо следует обратить внимание на то, что наиболее чувствительными к добавлению в питательную среду ЖК оказались гены *SnAGO1 и SnAGO18.*

Обсуждение

Оценка механизмов формирования устойчивости растений, в особенности против патогенов, представляет собой актуальную задачу, решение которой позволит эффективно регулировать устойчивость и добиться более высоких продуктивных свойств. Разнообразие способов питания фитопатогенных грибов способствовало эволюционному формированию различных способов защиты растений от них (McCombe et al., 2022). Например, против биотрофных патогенов, питающихся на живых тканях растений, запускаются механизмы защиты, при которых активную роль выполняет СК-зависимый сигнальный путь, формирующий системную приобретенную устойчивость. ЖК запускает иной сигнальный путь, названный системной индуцированной устойчивостью и защищающий растения от некротрофных патогенов и насекомых. В многочисленных исследованиях показано, что возбудитель септориоза *S. nodorum* характеризуется гемибиотрофным способом питания на растениях пшеницы, сочетающим в себе биотрофную фазу развития в начале патогенеза и некротрофную впоследствии, однако он способен и к сапротрофному росту на питательных средах (Oliver et al., 2012). Соответственно, в зависимости от сроков развития патогена в тканях растений хозяйские защитные системы должны четко распознавать эти переходные этапы.

Ранее нами показано, что высоковирулентный штамм патогенного гриба *S. nodorum* SnB может преодолеть защиту пшеницы, связанную с про- и антиоксидантной системой, включающей активацию каталаз (Трошина и др., 2010) и хитиндезацетилаз (Maksimov et al., 2011), а также накопление различных эффекторных молекул (Veselova et al., 2021). В этой работе мы провели анализ ряда генов *S. nodorum*, кодирующих белки-нуклеазы SnAGO, вовлеченные в механизм РНК-и, с использованием его в качестве модельного объекта.

Явление РНК-и представляет уникальный и древний механизм защиты генома эукариот, в том числе грибов, от чужеродной генетической информации, а также служащий для регуляции физиологических процессов. Ключевые компоненты этого сложного механизма иммунитета – РНК-нуклеазы AGO, функционально охарактеризованные на модельных организмах (Choi et al., 2014). Показано, что механизм РНК-и в системе иммунитета эукариот при взаимодействии хозяев со своими паразитами является «обоюдоострым инструментом», с одной стороны, защищающим хозяина от патогена, с другой, способствующим отключению патогеном накопления наиболее существенных защитных белков хозяина в целях использования его ресурсов для своего функционирования. Вместе с тем на сегодняшний день механизмы работы РНК-и в грибных системах, особенно при развитии болезней, изучены недостаточно, что ограничивает наше понимание этого явления.

Например, показано формирование совместимости между хозяином и патогеном с участием растительных белков AGO1 *Brassica napus* в условиях инфицирования растений грибами *V. dahliae* и *V. longisporum* (Shen et al., 2014). В растениях томата и арабидопсиса микроРНК, секретируемые грибом *Botrytis cinerea*, использовали хозяйские белки AGO1 для избирательного подавления трансляции хозяйских митоген-активируемых протеинкиназ (MAPKs), пероксиредоксина, а также ассоциированной с клеточной стенкой киназы, а подавление накопления этого белка в мутантных растениях арабидопсиса приводило к снижению их восприимчивости к грибу (Weiberg et al., 2013). F. Dunker с коллегами (2020) на растениях арабидопсиса показали, что подобное привлечение хозяйского белкового комплекса AGO1 характерно и для оомицета *Hyaloperonospora arabidopsidis,* филогенетически далекого от грибов патогена, что предполагает общее для патогенов свойство.

Выявлена важная роль механизма РНК-и в росте и развитии грибов, естественно отражающаяся впоследствии на их способности инфицировать растения. Так, мутанты Δago1 гриба *Colletotrichum higginsianum* демонстрировали серьезные дефекты в морфологии конидий (Campo et al., 2016). Делеция гена *FgAGO2* гриба *Fusarium graminearum* не влияла на фенотип гриба во время бесполой фазы (Chen et al., 2015), но этот ген оказался важным при прохождении грибом стадии споруляции и созревания аскоспор (Zeng et al., 2018). У другого вида гриба *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* штамма 4287 мутанты с подавленной экспрессией гена *FoQDE-2* (*AGO1*) (Jo et al., 2018) проявляли пониженную вирулентность в отношении растений томатов.

В настоящий момент практически отсутствуют работы, в которых бы обсуждалось поведение генов грибных патогенов, кодирующих белки, ответственные за РНК-и, в условиях непосредственного воздействия на них биостимуляторов и индукторов устойчивости, например СК и ЖК, или косвенного воздействия через инфицирование растений. Имеется ряд противоречивой информации о роли индукторов устойчивости растений в процессе работы механизма РНК-и в тканях растений под непосредственным воздействием СК и ЖК и в ответ на инфицирование патогенами. Например, некоторые авторы показывают, что СК-индуцированная устойчивость к патогенам затрагивает механизмы растительной РНК-и только через хозяйскую РНК-зависимую РНК-полимеразу (RDR1) и координируется этим белком (Lee et al., 2016). В то же время есть данные, согласно которым в растениях, например у риса, уровни экспрессии генов *OsAGO1a*, *OsAGO2* и *OsAGO18* оказались связаны с ЖК и в мутантных растениях риса coi1-13, не способных передавать сигналы ЖК, были ниже, чем у диких растений (Yang et al., 2020). Особенно это интересно в связи с тем, что у патогенного гриба пшеницы *S. nodorum* роль РНК-и в патогенности все еще остается нерешенной. Вместе с тем недавно проведен анализ участия РНК-и в развитии патогенности *Zymoseptoria tritici* – другого гриба, вызывающего септориоз листьев на пшенице после нокаутирования в его геноме генов *AGO1* и *AGO2* (Kettles et al., 2019; Ma et al., 2020). Анализ не показал качественных фенотипических изменений в развитии симптомов септориоза на восприимчивом сорте пшеницы Bobwhite. Мутантные по генам *AGO* штаммы грибов свойств вирулентности в отношении растений пшеницы не теряли. Из полученных результатов авторы делают вывод, что данные белки не играют значительной роли в процессах развития септориоза. Вместе с тем анализ экспрессионного статуса генов,

ответственных за работу механизма РНК-и у патогенного гриба *V. nonalfalfae*, вызывающего вертициллезное увядание у хмеля (*Humulus lupulus* L.), продемонстрировал, что более вирулентные штаммы патогена обладают более высоким уровнем накопления транскриптов *VnAGO* (Jeseničnik et al., 2019).

У устойчивого к патогену *S. nodorum* сорта пшеницы Омская 35 накопление транскриптов изученных генов *SnAGO* при грибном патогенезе в тканях листа было более активно, чем у восприимчивого сорта, что предполагает вовлечение изученных генов в процесс преодоления защитной системы хозяина и возможность регуляции активности этих генов в зависимости от степени устойчивости хозяина. Эти предположения дополнительно подтверждены в вариантах эксперимента, при которых растения были иммунизированы путем предварительной предпосевной обработки семян СК и ЖК, а также их композицией. Как можно заметить, уровень транскриптов патогенных генов *SnAGO* в этих вариантах также оказался выше, чем в контрольных, хотя с учетом соотношения домашних генов *SnTub*/Та*RLI* содержание гена *SnTub* в иммунизированных СК и ЖК растениях значительно ниже.

Интересные результаты получены нами при оценке активности транскрипции генов *SnAGO* после непосредственного воздействия СК и ЖК на мицелий гриба в культуре. Высокие концентрации СК усиливали накопление транскриптов изученных генов *SnAGO* в более ранние сроки культивирования, в то время как низкие концентрации не давали такого эффекта. ЖК стимулировала накопление транскриптов *SnAGO1, SnAGO3, SnAGO18* на ранних сроках культивирования и в более низких концентрациях по сравнению с СК. Можно предполагать, что грибные гены *SnAGO* чувствительны к непосредственному воздействию на мицелий гриба этих сигнальных молекул, позиционируемых в качестве индукторов защитных систем растений против патогенов. Таким образом, грибная система РНК-и активно реагирует на добавление в среду культивирования СК и ЖК, а также участвует в процессе инфицирования растений. При этом искусственное стимулирование защитных свойств растения запускает и накопление транскриптов *SnAGO* патогена. Полученные данные указывают на то, что гены *AGO*, участвующие в системе РНК-и гриба *S. nodorum* штамма SnB, эффективно взаимодействуют с инфицирующим растением, и, по всей видимости, это взаимодействие зависит от степени устойчивости хозяина.

Особый интерес представляет возможность оценки степени развития патогенов в тканях растений с использованием молекулярно-биологических методов, позволяющих определить уровень накопления в тканях нуклеиновых кислот патогена, так как визуальная оценка симптомов болезни зачастую субъективна и подвержена воздействию различных факторов. В данной работе оценка накопления генетического материала патогена в тканях растений проведена путем сравнения соотношения уровня транскриптов генов домашнего хозяйства гриба и пшеницы *SnTub*/*TaRLI*. Оценка соотношения транскриптов *SnTub*/*TaRLI* коррелировала с результатами визуального наблюдения развития болезни на листьях. Полученные результаты также показали, что наиболее эффективной в индуцировании защитных свойств растений пшеницы к септориозу оказалась предпосевная обработка семян ЖК, а также композицией ЖК и СК (см. рис. 1). С использованием уровня соотношения *SnTub*/*TaRLI* подтверждена динамика накопления биологического материала патогенного гриба, но в более ранние сроки наблюдений. Кроме того, нами продемонстрирована возможность применения полученных данных транскрипционной активности генов *AGO* гриба *S. nodorum* штамма SnB как объективного показателя активации системы его РНК-и.

Список литературы / References

Марченкова А.А., Неттевич Э.Д., Тушинский Т.Ю. Устойчивость яровой пшеницы к септориозу. *Вестник сельскохозяйственной науки*. 1991;7:110-115

[Marchenkova A.A., Nettevich E.D., Tushinsky T.Yu. Resistance of spring wheat to septoria blight. *Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki = Herald of Agricultural Sciences*. 1991;7:110-115 (in Russian)]

Трошина Н.Б., Сурина О.Б., Черепанова Е.А., Яруллина Л.Г. Сравнительная оценка H_2O_2-разлагающей активности агрессивных и неагрессивных штаммов *Septoria nodorum* Berk. *Микология и фитопатология*. 2010;44(3):273-279

[Troshina N.B., Surina O.B., Cherepanova E.A., Yarullina L.G., Maksimov I.V. Comparative evaluation of H_2O_2-degrading activity of aggressive *Septoria nodorum* strains. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2010;44(3):273-279 (in Russian)]

Шеин М.Ю., Бурханова Г.Ф., Мерзлякова А.Ю., Максимов И.В. Изменение транскрипционной активности генов *TaAGO2* и *TaAGO4* в растениях пшеницы при инфицировании грибом *Stagonospora nodorum* Berk. *Труды Кубанского государственного аграрного университета*. 2021;5(92):196-200. DOI 10.21515/1999-1703-92-196-200

[Shein M.Yu., Burkhanova G.F., Merzlyakova A.Yu., Maksimov I.V. Changes in transcriptional activity of *TaAGO2* and *TaAGO4* genes in wheat plants at infection with *Stagonospora nodorum* Berk. *Trudy Kubanskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Works of the Kuban State Agrarian University*. 2021;5(92):196-200. DOI 10.21515/1999-1703-92-196-200 (in Russian)]

Яруллина Л.Г., Трошина Н.Б., Черепанова Е.А., Заикина Е.А., Максимов И.В. Салициловая и жасмоновая кислота в регуляции про-антиоксидантного статуса листьев пшеницы при инфицировании *Septoria nodorum* Berk. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2011;47(5):602-608. DOI 10.1134/S0003683811050176

[Yarullina L.G., Troshina N.B., Cherepanova E.A., Zaikina E.A., Maksimov I.V. Salicylic and Jasmonic acids in regulation of the proantioxidant state in wheat leaves infected by *Septoria nodorum* Berk. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology.* 2011;47:549-555. DOI 10.1134/S0003683811050176 (in Russian)]

Ahmed F.F., Hossen M.I., Sarkar M.A.R., Konak J.N., Zohra F.T., Shoyeb M., Mondal S. Genome-wide identification of *DCL*, *AGO* and *RDR* gene families and their associated functional regulatory elements analyses in banana (*Musa acuminata*). *PLoS One*. 2021; 16(9):e0256873. DOI 10.1371/journal.pone.0256873

Campo S., Gilbert K.B., Carrington J.C. Small RNA-based antiviral defense in the phytopathogenic fungus *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS Pathog*. 2016;12:e1005640. DOI 10.1371/journal.ppat.1005640

Chen Y., Gao Q., Huang M., Liu Y., Liu Z., Liu X., Ma Z. Characterization of RNA silencing components in the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum. Sci. Rep*. 2015;5:12500. DOI 10.1038/srep12500

Choi J., Kim T., Jeon J., Wu J., Song H., Asiegbu F.O., Lee Y.H. funRNA: a fungi-centered genomics platform for genes encoding key

components of RNAi. *BMC Genomics*. 2014;15(Suppl. 9):S14. DOI 10.1186/1471-2164-15-S9-S14

Dunker F., Trutzenberg A., Rothenpieler J.S., Kuhn S., Pröls R., Schreiber T., Tissier A., Kemen A., Kemen E., Hückelhoven R., Weiberg A. Oomycete small RNAs bind to the plant RNA-induced silencing complex for virulence. *Elife*. 2020;9:e56096. DOI 10.7554/eLife.56096

Giménez M.J., Pistón F., Atienza S.G. Identification of suitable reference genes for normalization of qPCR data in comparative transcriptomics analyses in the Triticeae. *Planta*. 2011;233(1):163-173. DOI 10.1007/s00425-010-1290-y

Feng H., Xu M., Liu Y., Gao X., Yin Z., Voegele R.T., Huang L. The distinct roles of Argonaute protein 2 in the growth, stress responses and pathogenicity of the apple tree canker pathogen. *Forest Pathol*. 2017;47(5):e12354. DOI 10.1111/efp.12354

Fraaije B.A., Lovel D.J., Baldwin S. Septoria epidemics on wheat: combined use of visual assessment and PCR-based diagnostics of identity mechanism of diseases escape. *Plant Protect. Sci*. 2002; 38(11):421-424. DOI 10.17221/10512-PPS

Hane J.K., Lowe R.G., Solomon P.S., Tan K.C., Schoch C.L., Spatafora J.W., Crous P.W., Kodira C., Birren B.W., Galagan J.E., Torriani S.F., McDonald B.A., Oliver R.P. Dothideomycete plant interactions illuminated by genome sequencing and EST analysis of the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*. *Plant Cell*. 2007;19(11): 3347-3368. DOI 10.1105/tpc.107.052829

Jeseničnik T., Štajner N., Radišek S., Jakše J. RNA interference core components identified and characterized in *Verticillium nonalfalfae*, a vascular wilt pathogenic plant fungi of hops. *Sci. Rep*. 2019; 9(1):8651. DOI 10.1038/s41598-019-44494-8

Jo S.M., Ayukawa Y., Yun S.H., Komatsu K., Arie T. A putative RNA silencing component protein FoQde-2 is involved in virulence of the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *J. Gen. Plant Pathol*. 2018;84:395-398. DOI 10.1007/s10327-018-0800-9

Kettles G.J., Hofinger B.J., Hu P., Bayon C., Rudd J.J., Balmer D., Courbot M., Hammond-Kosack K.E., Scalliet G., Kanyuka K. sRNA profiling combined with gene function analysis reveals a lack of evidence for cross-kingdom RNAi in the wheat – *Zymoseptoria tritici* pathosystem. *Front. Plant Sci*. 2019;10:892. DOI 10.3389/fpls.2019.00892

Lee W.S., Fu S.F., Li Z., Murphy A.M., Dobson E.A., Garland L., Chaluvadi S.R., Lewsey M.G., Nelson R.S., Carr J.P. Salicylic acid treatment and expression of an RNA-dependent RNA polymerase 1 transgene inhibit lethal symptoms and meristem invasion during tobacco mosaic virus infection in *Nicotiana benthamiana*. *BMC Plant Biol*. 2016;16:15. DOI 10.1186/s12870-016-0705-8

Ma X., Wiedmer J., Palma-Guerrero J. Small RNA bidirectional crosstalk during the interaction between wheat and *Zymoseptoria tritici*. *Front. Plant Sci*. 2020;10:1669. DOI 10.3389/fpls.2019.01669

Maksimov I.V., Valeev A.Sh., Safin R.F. Acetylation degree of chitin in the protective response of wheat plants. *Biochemistry (Moscow).* 2011;76(12):1342-1346. DOI 10.1134/S0006297911120078

Meng H., Wang Z., Wang Y., Zhu H., Huang B. Dicer and Argonaute genes involved in RNA interference in the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii*. *Appl. Environ. Microbiol*. 2017;83(7): e03230-16. DOI 10.1128/AEM.03230-16

McCombe C.L., Greenwood J.R., Solomon P.S., Williams S.J. Molecular plant immunity against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic fungi. *Essays Biochem.* 2022;66(5):581-593. DOI 10.1042/EBC20210073

Neupane A., Feng C., Mochama P.K., Saleem H., Lee Marzano S.Y. Roles of Argonautes and Dicers on *Sclerotinia sclerotiorum* antiviral RNA silencing. *Front. Plant Sci*. 2019;10:976. DOI 10.3389/fpls.2019.00976

Oliver R.P., Friesen T.L., Faris J.D., Solomon P.S. *Stagonospora nodorum*: From pathology to genomics and host resistance. *Annu. Rev. Phytopathol*. 2012;50:23-43. DOI 10.1146/annurev-phyto-081211-173019

Pradhan M., Pandey P., Baldwin I.T., Pandey S.P. Argonaute 4 modulates resistance to *Fusarium brachygibbosum* infection by regulating Jasmonic acid signaling. *Plant Physiol*. 2020;184(2):1128-1152. DOI 10.1104/pp.20.00171

Raman V., Simon S.A., Demirci F., Nakano M., Meyers B.C., Donofrio N.M. Small RNA functions are required for growth and development of *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Plant Microbe Interact*. 2017;30(7):517-530. DOI 10.1094/MPMI-11-16-0236-R

Shen D., Suhrkamp I., Wang Y., Liu S., Menkhaus J., Verreet J.A., Fan L., Cai D. Identification and characterization of microRNAs in oilseed rape (*Brassica napus*) responsive to infection with the pathogenic fungus *Verticillium longisporum* using Brassica AA (*Brassica rapa*) and CC (*Brassica oleracea*) as refer. *New Phytol.* 2014; 204(3):577-594. DOI 10.1111/nph.12934

Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA 11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol*. 2021;38(7):3022-3027. DOI 10.1093/molbev/msab120

Veselova S., Nuzhnaya T., Burkhanova G., Rumyantsev S., Maksimov I. Reactive oxygen species in host plant are required for an early defense response against attack of *Stagonospora nodorum* Berk. necrotrophic effectors SnTox. *Plants.* 2021;10(8):1586. DOI 10.3390/plants10081586

Wang Q., An B., Hou X., Guo Y., Luo H., He C. Dicer-like proteins regulate the growth, conidiation, and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Hevea brasiliensis. Front Microbiol*. 2018;8: 2621. DOI 10.3389/fmicb.2017.02621

Weiberg A., Wang M., Lin F.M., Zhao H., Zhang Z., Kaloshian I., Huang H.D., Jin H. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science*. 2013; 342(6154):118-123. DOI 10.1126/science.1239705

Yang Z., Huang Y., Yang J., Yao S., Zhao K., Wang D., Qin Q., Bian Z., Li Y., Lan Y., Zhou T., Wang H., Liu Ch., Wang W., Qi Y., Xu Z., Li Y. Jasmonate signaling enhances RNA silencing and antiviral defense in rice. *Cell Host Microbe*. 2020;28(1):89 103.e8. DOI 10.1016/j.chom.2020.05.001

Zhang H., Xia R., Meyers B.C., Walbot V. Evolution, functions, and mysteries of plant ARGONAUTE proteins. *Curr. Opin. Plant Biol*. 2015;27:84-90. DOI 10.1016/j.pbi.2015.06.011

Zeng W., Wang J., Wang Y., Lin J., Fu Y., Xie J., Jiang D., Chen T., Liu H., Cheng J. Dicer-Like proteins regulate sexual development via the biogenesis of perithecium-specific MicroRNAs in a plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Front Microbiol*. 2018; 9:818. DOI 10.3389/fmicb.2018.00818

ORCID

M.Yu. Shein orcid.org/0000-0002-3743-9928
G.F. Burkhanova orcid.org/0000-0003-2346-3502
I.V. Maksimov orcid.org/0000-0002-5707-3265

Благодарности. Работа выполнена в рамках гранта РФФИ-аспирант № 20-34-90004.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.04.2023. После доработки 19.09.2023. Принята к публикации 25.09.2023.