BIOMICS/БИОМИКА

ISSN 2221-6197 http://biomicsj.ru

ВЛИЯНИЕ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК, СИНТЕЗИРОВАННЫХ *IN VITRO*, НА РОСТ И СПОРУЛЯЦИЮ ПАТОГЕННОГО ГРИБА *STAGONOSPORA NODORUM*

*Нужная Т.В.[1,2], Сорокань А.В.[1], Веселова С.В.[1], Максимов И.В.[1]

[1]Институт биохимии и генетики - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского Федерального исследовательского центра РАН, Россия, Уфа, 450054, Проспект Октября, 71
[2]Уфимский институт биологии - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского Федерального исследовательского центра РАН, Россия, Уфа, 450054, Проспект Октября, 69, *e-mail: tanyawww89@mail.ru

Резюме

В последнее время для защиты сельскохозяйственных культур в некоторых странах используются несколько механизмов профилактики заболеваний на основе РНК-интерференции с использованием малых РНК. Растения выделяют малые РНК, которые прямо или косвенно ингибируют вирулентность возбудителей заболеваний, которая определяется эффекторами. В данной работе было изучено влияние трех пшеничных микроРНК (miR159, miR166 и miR408), синтезированных *in vitro* на рост и споруляцию патогенного гриба *Stagonospora nodorum*, а также на экспрессию генов некротрофных эффекторов (НЭ) *S. nodorum SnToxA* и *SnTox3* и грибных транскрипционных факторов (ТФ) *Pf2, StuA, Con7*, регулирующих транскрипцию генов НЭ. Было показано, что внесение микроРНК в различных концентрациях в среду культивирования грибов влияло на рост колоний и споруляцию патогена. Наибольшее влияние на эти показатели оказала miR166. С помощью геноспецифичных праймеров был проведен ПЦР-анализ, который показал, что влияние микроРНК на экспрессию генов, кодирующих НЭ и ТФ патогенного гриба *S. nodorum* зависело от вида и концентрации микроРНК в среде. Так, оцРНК408 в концентрации 0.5 нг/мкл снижала экспрессию всех изученных генов НЭ и ТФ на 7 сутки культивирования. Дальнейшие всесторонние исследования механизмов межвидовой регуляции с помощью миРНК могут помочь в разработке новых пестицидов в современном сельском хозяйстве.

Ключевые слова: *Stagonospora nodorum* Berk., *Triticum* L., РНК интерференция, микроРНК, некротрофные эффекторы *Sn*ToxA и *Sn*Tox3, транскрипционные факторы *SnPf2, SnStuA* и *SnCon7*

Цитирование: Нужная Т.В., Сорокань А.В., Веселова С.В., Максимов И.В. Влияние малых интерферирующих РНК, синтезированных *in vitro*, на рост и споруляцию патогенного гриба *Stagonospora nodorum* // Biomics. 2024. Т.16(1). С. 48-55. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2024-5

INFLUENCE OF SMALL INTERFERING RNA SYNTHESIZED *IN VITRO* ON THE GROWTH AND SPORULATION OF THE PATHOGENIC FUNGUS *STAGONOSPORA NODORUM*

*Nuzhnaya T.V.[1,2], Sorokan A.V.[1], Veselova S.V.[1], Maksimov I.V.[1]

[1]Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Federal Research Centre Russian Academy of Sciences, 71 Prospekt Oktyabrya, Ufa, Russian Federation, 450054
[2]Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre, Russian Academy of Sciences, 69 Prospekt Oktyabrya, Ufa, Russian Federation, 450054, *e-mail: tanyawww89@mail.ru

Resume

Recently, several RNA interference-based disease prevention mechanisms using small RNAs have been used to protect crops in some countries. Plants secrete small RNAs that directly or indirectly inhibit the virulence of pathogens. In this work, we studied the effect of three wheat microRNAs (miR159, miR166 and miR408) synthesized in vitro on the growth and sporulation of the pathogenic fungus *Stagonospora nodorum*, as well as on the expression of the genes of the necrotrophic effectors (NEs) *S. nodorum SnToxA* and *SnTox3* (which determine the virulence of the pathogen) and the fungal transcription factors (TFs) *Pf2, StuA, Con7* regulating the transcription of NE genes. It was shown that the addition of microRNAs in various concentrations into the fungal cultivation medium affected the growth of colonies and sporulation of the pathogen. miR166 had the greatest impact on these parameters. Using gene-specific primers, PCR analysis was carried out, which showed that the effect of microRNA on the expression of the genes encoding NEs and TFs of the pathogenic fungus *S. nodorum* depended on the type and concentration of microRNA in the medium. Thus, 0.5 ng/μl of ssRNA408 reduced the expression of all the studied NEs and TFs genes on the 7^{th} day of cultivation. Further comprehensive studies of the mechanisms of cross-species regulation using miRNAs may help in the development of new pesticides for modern agriculture.

Keywords: *Stagonospora nodorum* Berk., *Triticum* L., RNA interference, microRNA, necrotrophic effectors *SnToxA* and *SnTox3*, transcription factors *SnPf2, SnStuA* and *SnCon7*

Citation: Nuzhnaya T.V., Sorokan A.V., Veselova S.V., Maksimov I.V. Influence of small interfering RNA synthesized *in vitro* on the growth and sporulation of the pathogenic fungus *Stagonospora nodorum*. *Biomics*. 2024. V.16(1). P.48-55. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2024-5 (In Russian)

Введение

Современная практика защиты растений и улучшения продукции урожая, как правило, основывается на химической обработке, которая наносит вред окружающей среде и оказывает негативное воздействие на здоровье человека. Альтернативой для применения химических препаратов являются подходы по созданию трансгенных растений, которые в современном мире пока не нашли одобрения в обществе. Таким образом, развитие новых экологически чистых подходов для улучшения качеств растений без модификации генома является актуальной задачей [Dubrovina, Kiselev, 2019; Dubrovina et al., 2020]. В последнее время для защиты сельскохозяйственных культур в некоторых странах используются несколько механизмов профилактики заболеваний на основе РНК-интерференции (РНКи), такие как сайленсинг, индуцируемый растением-хозяином (HIGS – host-induced gene silencing) и спрей-индуцированный сайленсинг генов (SIGS – spray-induced gene silencing) [Mahanty et al., 2023]. Суть SIGS заключается в простом внесении двухцепочечных РНК (дцРНК) или микроРНК (миРНК) в жидкую культуру или распылении ее по поверхности твердого объекта, например, листа [Dubrovina, Kiselev, 2019]. Это открытие позволило заговорить о новой стратегии защиты растений и замене пестицидов.

РНК-интерференция — это биологический процесс, при котором малые РНК ингибируют экспрессию генов-мишеней путем нейтрализации целевых молекул мРНК посредством их деградации или модификации гистонов и метилирования ДНК, а также ингибируют трансляцию белка [Yang et al., 2021; Jiang et al., 2023]. Малые РНК представляют собой короткие функциональные регуляторные молекулы РНК длиной 20–30 нуклеотидов, которые участвуют в росте, развитии, метаболизме, целостности генома и взаимодействии растений и патогенов [Huang et al., 2019]. Среди прочего, основными функциями малых РНК растений являются подавление инфекций патогенов и вредителей путем индукции РНКи [Mahanty et al., 2023]. Кроме того, некоторое время назад было обнаружено перемещение малых РНК между видами, относящимися к различным царствам (cross-kingdom RNA interference). Такой обмен малыми РНК (RNA trafficking) был описан у многих взаимодействующих организмов, включая растения, микроскопические грибы, насекомые, бактерии и симбионты [Huang et al., 2019; Yang et al., 2021; Jiang et al., 2023]. Растения выделяют малые РНК, которые прямо или косвенно ингибируют вирулентность возбудителей заболеваний [Zhang et al., 2016].

Вирулентность многих патогенных грибов определяется эффекторами. Более 80 эффекторных белков были клонированы и охарактеризованы из основных грибов, заражающих сельскохозяйственные культуры [Mahanty et al., 2023]. Основными факторами вирулентности *Stagonospora nodorum* (Berk.), патогенного гриба из класса Dothideomycetes, поражающего растения пшеницы и вызывающего септориоз листьев и колоса, являются многочисленные грибные некротрофные эффекторы (НЭ), кодируемые генами *SnTox* [Haugrud et al., 2022]. Из всех НЭ SnToxA, SnTox1 и SnTox3 идентифицированы на генном и белковом уровнях и считаются наиболее распространенными среди штаммов и изолятов возбудителя [Haugrud et al., 2022]. Основная роль НЭ *S. nodorum* заключается в индукции гибели клеток-хозяев путем манипулирования защитными сигнальными путями растений, в том числе гормональными, а регуляция экспрессии генов эффекторов осуществляется грибными ТФ, такими как *Pf2, StuA, Con7* и другими [Tan, Oliver, 2017].

Следует отметить, что фитогормоны играют важную роль в развитии PAMP-индуцируемого иммунитета (PAMP-triggered immunity - PTI) и эффектор-индуцируемого иммунитета (effector-triggered immunity - ETI) в ответ на проникновение вирусов, грибов и бактерий. Механизм вирулентности, обеспечиваемый эффекторами патогена, также связан с подавлением иммунной системы растения-хозяина, НЭ подавляют PTI и используют путь ETI хозяина для развития восприимчивости [Haugrud et al., 2022]. Кроме того, все больше данных показывает, что миРНК участвуют в PTI и ETI, развивающихся при атаке патогенов. В частности, миРНК участвуют в регуляции различных защитных сигналов и путей, включая гормональные сигналы и продукцию АФК [Yang et al., 2021; Jiang et al., 2023]. Несмотря на то, что в последние годы накоплен большой объем информации о миРНК, участвующих во взаимодействиях растений и патогенов, требуется более глубокое понимание физиологической и молекулярной роли миРНК.

Исходя из этих данных мы предполагаем, что консервативные миРНК могут проникать в клетку патогенного гриба и прямо или косвенно влиять на экспрессию генов вирулентности патогена. Результаты, полученные в данной работе, могут помочь в разработке дцРНК и метода SIGS против патогена *S. nodorum*, а также патогенов возбудителей листовых пятнистостей злаковых культур. В связи с этим целью данной работы было изучить влияние малых интерферирующих РНК, синтезированных *in vitro*, на рост и споруляцию патогенного гриба *S. nodorum*, а также на экспрессию генов НЭ *S. nodorum* SnToxA и SnTox3 и грибных ТФ *Pf2, StuA, Con7*, регулирующих транскрипцию генов НЭ.

Материалы и методы

В работе был использован изолят *S. nodorum* SnБ, который содержал в геноме гены двух НЭ – ToxA и Tox3, а также гены ТФ *Pf2, StuA* и *Con7* [Nuzhnaya et al., 2023a].

Изолят *S. nodorum* содержали при 4°С на зернах ячменя. Исследования проводили в асептических условиях. Для получения препарата спор гриба споро-мицелиальную массу зерен ячменя замачивали в стерильной дистиллированной воде, затем суспензию спор наносили на поверхность картофельно-глюкозного агара (КГА) и выдерживали в термостате при 18°С в течение 14 суток. Из полученных колоний для дальнейших экспериментов использовали участки мицелия (или мицелия со спорами) 5х5 мм, которые переносили на среды с добавлением модифицированных малых РНК, синтезированных *in vitro*, одноцепочечных РНК (оцРНК) или дуплекса миРНК в различных концентрациях 0.05 и 0.5 нг/мкл и без таковых. В работе были использованы две питательные среды для выращивания *S. nodorum*. КГА с добавлением глюкозы 20 г/л использовался при изучении ростовых характеристик и спорообразования. Жидкая питательная среда (картофельно-глюкозный бульон) использовалась при изучении экспрессии грибных генов.

Измерение диаметра колоний и площади мицелия проводили на 7 сутки роста. Интенсивность споруляции оценивали визуально и путем прямого подсчета на 10 сутки. Для подсчета спор поверхность колоний заливали 5 мл дистиллированной воды и инкубировали в течение 10 минут, споры в аликвотах подсчитывали с использованием камеры Фукса-Розенталя. Об интенсивности споруляции судили по количеству спор на колонию.

Суммарную РНК выделяли из мицелия изолята *S. nodorum* SnБ, через 3 и 7 суток культивирования на жидкой среде реагентом TRIzol™ (Sigma, Германия) согласно протоколу фирмы-поставщика. Анализ экспрессии генов НЭ и ТФ (*SnToxA, SnTox3, SnStuA, SnPf2* и *SnCon7*) у изолята *S. nodorum* SnБ проводили с помощью метода количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе iCycler iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) с применением интеркалирующего красителя SYBR Green I (Синтол, Россия). Праймеры были разработаны с помощью онлайн ресурса IDT PrimerQuest (http://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home) [Nuzhnaya et al., 2023a]. Для нормирования результатов экспрессии исследуемых генов использовали праймеры к гену конститутивно экспрессирующегося тубулина *S. nodorum* (S56922).

Получение модифицированных микроРНК. Для стабилизации микроРНК при инокуляции гриба, т. е.

для защиты этих молекул от действия различных нуклеаз на 3'-конец был добавлен метилированный кэп, на 5' конец добавляли фосфатную группу [Dubrovina et al., 2020]. Малые РНК в растительном организме представляют собой 5'-фосфорилированные дуплексы РНК длиной 20–24 нуклеотида, содержащие 2 нуклеотида на 3'-выступающей части на обоих концах. Кроме того, растительные миРНК часто модифицируются путем 2'-O-метилирования на 3'-концах с помощью HUA ENHANCER 1 (HEN1) для придания стабильности и предотвращения деградации нуклеазами [Dubrovina et al., 2020].

В данной работе олигонуклеотиды одноцепочечной РНК (оцРНК), кодирующие консервативные микроРНКmiR159, miR166 и miR408, были синтезированы *in vitro*, модифицированы с помощью присоединения фосфатной группы (PO_4-) к 5' концу и метильной группы (CH_3-) к 3' концу и очищены методом ВЭЖХ с помощью компании Syntol (Москва, Россия). Последовательности олигонуклеотидов микроРНК приведены в табл. 1.

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов / Table 1. Oligonucleotide sequences

№	название праймера Primer name	нуклеотидная последовательность, 5'→3' Nucleotide sequence, 5'→3'	Вставка Insert	
			3'	5'
1	tae-miR408-M	cug-cac-ugc-cuc-uuc-ccu-ggc	2'-Оме	PO_4-
2	tae-miR159a-MF	uuu-gga-uug-aag-gga-gcu-cug	2'-Оме	PO_4-
3	tae-miR159a-MR	gag-cuc-ccu-uca-auc-caa-auu	2'-Оме	PO_4-
4	tae-miR166a-M	ucg-gac-cag-gcu-uca-auc-ccu	2'-Оме	PO_4-

Для формирования дуплексов miR159a равные объемы оцРНКtae-miR159a-MF и tae-miR159a-MR, разведенных до концентрации 100 пмоль/мкл, объединяли и отжигали при 90 °С в течение 1 мин. Затем смесь медленно охлаждали до комнатной температуры. Схемы оцРНК и дуплекса миРНК159 изображены на рис. 1.

(a)

оцРНК159
ssRNA159

5'-PUUUGGAUUGAAGGGAGCUCUGMe-3'

(b)

оцРНК408
ssRNA408

5'-PCUGCACUGCCUCUUCCCUGGCMe-3'

(c)

оцРНК166
ssRNA166

5'-PUCGGACCAGGCUUCAAUCCCUMe-3'

(d)

дуплекс миРНК159
miRNA159 duplex

```
      5'-PUUUGGAUUGAAGGGAGCUCUGMe-3'
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
3'-MeUUAAACCUAACUUCCCUCGAGP-5'
```

Рис. 1. Схематическое изображение одноцепочечных модифицированных микроРНК: оцРНК159 (a), оцРНК408 (b), оцРНК166 (c) и дуплекса миРНК159 (d).
Fig. 1. Schematic representation of single-stranded modified microRNAs: miRNA159 (a), miRNA408 (b), miRNA166 (c) and miRNA159 duplex (d).

Внесение модифицированных миРНК синтезированных *in vitro* в твердую и жидкую культуру *S. nodorum* проводили в стерильных условиях. Для этого миРНК разводили в свободной от нуклеаз воде до получения концентрации 500 нг/мкл. Затем нужный объем каждой миРНК добавляли в среду культивирования гриба после автоклавирования до конечных концентраций 0.05 и 0.5 нг/мкл. После чего на среды высаживали патоген. Концентрации модифицированных миРНК подбирали по литературным данным [Kettles et al., 2019].

Все эксперименты повторяли 3 раза в трех биологических повторах. На графиках и в таблицах приведены средние арифметические значения и их доверительные интервалы, рассчитанные по стандартным ошибкам. Достоверность различий между вариантами опыта оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) в соответствии с тестом Дункана при доверительном уровне $p \leq 0.05$ с использованием программного обеспечения STATISTICA 10.0.

Результаты и обсуждение

В нашей работе были изучено влияние трех консервативных миРНК, miR159, miR166 и miR408 на развитие и вирулентность патогена *S. nodorum*. Выбор миРНК был основан на наших предыдущих результатах, в которых было показано, что именно эти миРНК принимали участие в развитии устойчивости растений пшеницы к *S. nodorum*. Ранее нами было показано, что эти миРНК влияли на устойчивость пшеницы к *S. nodorum* посредством регуляции гормональных сигнальных путей, окислительно-восстановительного метаболизма растений и взаимодействия с эффекторами патогенаSnToxA и SnTox3 [Nuzhnaya et al., 2023b]. Также было показано, что SnTox3 подавлял экспрессию miR159a и miR408, а SnToxA подавлял экспрессию miR166 [Nuzhnaya et al., 2023b].

Наши результаты показали, что внесение миРНК в среду культивирования гриба влияло на рост колоний и споруляцию патогена (табл. 2). Это влияние зависело как от вида миРНК, так и от ее концентрации. оцРНК159 независимо от концентрации не влияла на рост мицелия и повышала количество спор на колонию (табл. 2), дуплекс миРНК159 только в концентрации 0.5 нг/мкл повышал количество спор на колонию (табл. 2). оцРНК408 независимо от концентрации не влияла на рост мицелия, но в концентрации 0.5 нг/мкл уменьшала количество спор на колонию (табл. 2). оцРНК166 в низкой концентрации 0.05 нг/мкл не влияла на рост и споруляцию патогена, а в большей концентрации 0.5 нг/мкл уменьшала как рост мицелия, так споруляцию (табл. 2). Так было показано, что миРНК166 и миРНК159 хлопка транслоцированные в мицелий патогена *Verticillium dahlia* ингибировали образование микроядер и рост мицелия гриба [Zhang et al., 2016]. Также сайленсинг генов «домашнего хозяйства», например, гена *CYP51* в *Fusariumgraminearum*, необходимого для биосинтеза эргостерола, с помощью дцРНК приводил к подавлению роста гриба и изменению его морфологических свойств [Kochetal., 2013].Подавление экспрессии гена миозин-5 (MYO5) у гриба *Fusarium asiaticum* с помощью двухцепочечных молекул приводило к возникновению дефектов клеточных стенок, оказывая непосредственное влияние на рост мицелия, жизнедеятельность и вирулентность гриба [Song et al., 2018].

Таблица 2. Влияние микроРНК на рост колоний и споруляцию гриба *S. nodorum*
Table 2. Effect of microRNAs on colony growth and sporulation of the fungus *S. nodorum*

Вариант обработки Treatment option	Концентрация модифицированных оцРНК и дуплекса миРНК, нг/мкл Concentration of modified ssRNA and miRNA duplex, ng/µl	Площадь колонии на 7 сутки культивирования, см^2 Colony area on day 7 of cultivation, cm^2	Количество спор на колонию на 10 сутки культивирования, спор х 10^3 Number of spores per colony on day 10 of cultivation
S. nodorum	-	8.8 ± 0.05	2000 ± 40
S. nodorum + дуплекс миРНК159	0.05	8.3 ± 0.04	2200 ± 42
	0.5	9.1 ± 0.06	3123 ± 56*
S. nodorum + оцРНК159	0.05	8.6 ± 0.05	3100 ± 55*
	0.5	9.1 ± 0.07	3120 ± 57*
S. nodorum + оцРНК408	0.05	8.8 ± 0.05	2000 ± 38
	0.5	9.1 ± 0.06	1750 ± 29**
S. nodorum + оцРНК166	0.05	8.6 ± 0.06	2100 ± 35
	0.5	7.5 ± 0.03 *	1640 ± 22**

Примечание: Звездочки (*) показывают статистически значимые различия между вариантами согласно тесту Дункана при $p \leq 0.05$

Влияние миРНК на экспрессию факторов вирулентности патогенного гриба *S. nodorum* генов ТФ (*SnStuA, SnPf2* и *SnCon7*) и НЭ (*SnToxA* и *SnTox3*) также зависело от концентрации миРНК (табл. 3). Так оцРНК в концентрации 0.05 нг/мкл слабо влияли на экспрессию генов ТФ и НЭ (табл. 3). оцРНК166 в концентрации 0.05 нг/мкл не снижала экспрессию данных генов на 3 и 7 сутки культивирования, за некоторыми исключениями (*SnPf2, SnCon7* и*SnToxA*) (табл. 3). оцРНК408 0.05 нг/мкл снижала экспрессию изучаемых генов (за исключением *SnToxA*) только на 3 сутки культивирования, а на 7 сутки этой концентрации было уже недостаточно (табл. 3).

Таблица 3. Влияние микроРНК на экспрессию генов, кодирующих факторы вирулентности – ТФ и НЭ
Table 3. Effect of microRNAs on the expression of genes encoding virulence factors – TF and NE

Обозначение гена Gene name	Сутки культивирования Cultivation time	Вариант обработки Treatmentoption				
		S. nodorum	*S. nodorum* + дуплекс миРНК159 *S. nodorum* + miRNA159 duplex	*S. nodorum* + оцРНК159 *S. nodorum* + ssRNA159	*S. nodorum* + оцРНК408 *S. nodorum* + ssRNA408	*S. nodorum* + оцРНК166 *S. nodorum* + ssRNA166
Концентрация модифицированных оцРНК и дуплекса миРНК 0.05 нг/мкл Concentration of modified ssRNA and miRNA duplex 0.05 ng/µl						
SnPf2	3	0.99 ± 0.04	0.91 ± 0.04	0.83 ± 0.03	0.68 ± 0.05	1.26 ± 0.06
	7	1.0 ± 0.05	1.07 ± 0.03	0.38 ± 0.002	1.48 ± 0.08	0.36 ± 0.03
SnStuA	3	0.99 ± 0.04	0.01 ± 0.003	0.6 ± 0.04	0.6 ± 0.04	3.34 ± 0.3
	7	0.99 ± 0.04	0.73 ± 0.07	1.84 ± 0.11	1.43 ± 0.03	1.64 ± 0.08
SnCon7	3	1.0 ± 0.03	0.1 ± 0.003	0.48 ± 0.03	0.53 ± 0.04	3.94 ± 0.4
	7	0.99 ± 0.04	1.2 ± 0.03	0.29 ± 0.02	1.46 ± 0.1	0.31 ± 0.03
SnToxA	3	1.03 ± 0.03	1.16 ± 0.08	0.07 ± 0.006	1.31 ± 0.07	0.19 ± 0.02
	7	0.97 ± 0.04	0.11 ± 0.003	10.7 ± 0.8	2.28 ± 0.05	14.4 ± 1.2
SnTox3	3	1.01 ± 0.03	0.11 ± 0.003	0.30 ± 0.05	0.31 ± 0.02	1.59 ± 0.1
	7	1.0 ± 0.03	0.84 ± 0.07	1.97 ± 0.08	2.1 ± 0.15	1.08 ± 0.04
Концентрация модифицированных оцРНК и дуплекса миРНК 0.5 нг/мкл Concentration of modified ssRNA and miRNA duplex 0.5 ng/µl						
SnPf2	3	0.99 ± 0.04	0.12 ± 0.007	0.91 ± 0.04	0.18 ± 0.007	1.03 ± 0.03
	7	1.0 ± 0.03	0.58 ± 0.04	1.0 ± 0.03	0.85 ± 0.04	1.03 ± 0.03
SnStuA	3	0.99 ± 0.04	2.86 ± 0.17	0.33 ± 0.002	2.85 ± 0.2	0.30 ± 0.04
	7	0.99 ± 0.04	2.95 ± 0.17	0.17 ± 0.02	0.08 ± 0.007	0.24 ± 0.002
SnCon7	3	1.0 ± 0.03	2.17 ± 0.19	0.51 ± 0.04	1.72 ± 0.08	0.65 ± 0.003
	7	0.99 ± 0.04	0.53 ± 0.05	0.78 ± 0.04	0.13 ± 0.01	0.47 ± 0.04
SnToxA	3	1.03 ± 0.03	10.0 ± 0.7	0.01 ± 0.003	14.9 ± 0.9	0.71 ± 0.04
	7	0.97 ± 0.04	4.7 ± 0.4	0.09 ± 0.008	0.06 ± 0.004	0.08 ± 0.006
SnTox3	3	1.01 ± 0.03	5.0 ± 0.4	0.41 ± 0.003	5.5 ± 0.4	0.69 ± 0.07
	7	1.0 ± 0.03	1.6 ± 0.08	0.67 ± 0.04	0.09 ± 0.007	0.5 ± 0.04

оцРНК159 в концентрации 0.05 нг/мкл снижала экспрессию изучаемых генов *S. nodorum* (за исключением *SnPf2* и *SnCon7*) только на 3 сутки культивирования (табл. 3). Напротив, оцРНК166 и оцРНК159 в концентрации 0.5 нг/мкл снижали экспрессию четырех генов кроме *SnPf2* на 3 и 7 сутки культивирования (табл. 3). оцРНК408 0.5 нг/мкл снижала экспрессию всех генов на 7 сутки культивирования (табл. 3). Кроме того, оцРНК166 и оцРНК408 в концентрации 0.5 нг/мкл тормозили образование спор, а оцРНК166 и рост мицелия *S. nodorum* (табл. 2).

Дуплекс миРНК159 действовал в меньшей концентрации 0.05 нг/мкл, снижая экспрессию четырех генов *S. nodorum* кроме *SnPf2* на 3 и 7 сутки культивирования (табл. 3), но при этом не влиял на рост мицелия и споруляцию (табл. 2). Концентрация 0.5 нг/мкл дуплекса миРНК159 снижала экспрессию только гена *SnPf2*, но повышала содержание РНК всех остальных генов *S. nodorum*, особенно *SnToxA* и *SnTox3* (табл. 2), при этом увеличивая споруляцию патогена (табл. 2).

Малые РНК очень мобильны и способны перемещаться по всему организму [Koch et al., 2016]. У растений они, как правило, передвигаются по флоэме из областей с высокой концентрацией в места с дефицитом этих молекул [Ding et al., 2024]. Помимо своей роли в регуляции экспрессии эндогенных генов, миРНК также действуют как межклеточные сигнальные молекулы, способствуя межвидовой регуляции между растениями и микроорганизмами [Ding et al., 2024]. Межвидовая генетическая регуляция, опосредованная миРНК, важна во взаимодействиях растений и микробов. Так, например, растения хлопчатника экспортировали в гифы гриба *V. dahliae* Kleb. миРНК (miR166 и miR159), которые отрицательно воздействовали на экспрессию генов, кодирующих факторы вирулентности Ca^{2+}-зависимую цистеиновую протеазу (Clp-1) и изотриходермин-C-15-гидроксилазу (HiC-15) [Zhang et al., 2016]. Это дополнительно ингибировало колонизацию *V. dahliae* в хлопке, повышая устойчивость растений к патогену [Zhang et al., 2016]. Кроме того, определили, что миРНК1001 из томатов снижает вирулентность *Botrytis cinerea* в инфицированных растениях томата, воздействуя на АТФ-зависимые металлопептидазы и эндопептидазы цистеинового типа в *B. cinerea* [Meng et al., 2020]. Более того, миРНК1023 пшеницы подавляет ген α/β гидролазы *F. graminearum*, препятствуя инвазии *F. graminearum* [Jiao, Peng, 2018].

Таким образом, можно сделать вывод, чтотри изученные миРНК пшеницы (miR159, miR166 и miR408) влияли на рост и споруляцию патогена *S. nodorum*, а также на факторы вирулентности ТФ и НЭ. Стоит отметить, что действовали как одноцепочечные, так и двухцепочечные РНК.

Появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что растительные миРНК обладают способностью мигрировать от растений к другим видам растений, микробам, насекомым и даже клеткам млекопитающих, что позволяет им регулировать определенные генетические процессы. Это свойство позволяет этим небольшим молекулам служить альтернативными биопестицидами в современном сельском хозяйстве. Многие из идентифицированных растительных миРНК проявляют регуляторные функции при переносе между разными царствами [Ding et al., 2024].

Всесторонние исследования механизмов межвидовой регуляции с помощью миРНК могут помочь в разработке новых пестицидов в современном сельском хозяйстве.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта МК-2293.2022.1.4.

Литература

1. Ding T., Li W., Li F., Ren M., Wang W. microRNAs: Key Regulators in plant responses to abiotic and biotic stresses via endogenous and cross-kingdom mechanisms // Int. J. Mol. Sci. 2024. V. 25. P. 1154. doi: 10.3390/ijms25021154
2. Dubrovina A.S., Aleynova O.A., Suprun A.R., Ogneva Z.V., Kiselev K.V. Transgene suppression in plants by foliar application of in vitro-synthesized small interfering RNAs // Applied Microbiology and Biotechnology. 2020. V. 104. P. 2125–2135. doi: 10.1007/s00253-020-10355-y
3. Dubrovina A.S., Kiselev K.V. Exogenous RNAs for gene regulation and plant resistance // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 2282. doi: 10.3390/ijms20092282
4. Peters Haugrud A.R., Zhang Z., Friesen T.L., Faris J.D. Genetics of resistance to *Septoria nodorum* blotch in wheat // Theoretical and Applied Genetics. 2022. V. 135. V. 3685–3707. doi: 10.1007/s00122-022-04036-9
5. Huang C.Y., Wang H., Hu P., Hamby R., Jin H. Small RNAs - Big players in plant-microbe interactions // Cell Host Microbe. 2019. V. 26. P. 173–182. doi: 10.1016/j.chom.2019.07.021
6. Jiao J., Peng D. Wheat microRNA1023 suppresses invasion of *Fusarium graminearum* via targeting and silencing FGSG_03101 // J. Plant Interact. 2018. V. 13. P. 514–521. doi: 10.1080/17429145.2018.1528512
7. Jiang C.H., Li Z.J., Zheng L.Y., Yu Y.Y., Niu D.D. Small RNAs: Efficient and miraculous effectors that play key roles in plant-microbe interactions // Molecular Plant Pathology. 2023. V. 24. P. 999–1013. doi: 10.1111/mpp.13329
8. 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. V. 10. P. 892. doi: 10.3389/fpls.2019.00892
9. Koch A., Kumar N., Weber L., Keller H., Imani J., Kogel K.-H. Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14α-demethylase-encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species // Proc Natl Acad Sci USA. 2013. V.110. P. 19324–19329. doi: 10.1073/pnas.1306373110
10. Mahanty B., Mishra R., Joshi R.K. Cross-kingdom small RNA communication between plants and fungal phytopathogens-recent updates and prospects for future agriculture // RNA BIOLOGY. 2023. V. 20(1). P. 109–119. doi: 10.1080/15476286.2023.2195731
11. Meng X., Jin W., Wu F. Novel tomato miRNA miR1001 initiates cross-species regulation to suppress the conidiospore germination and infection virulence of *Botrytis cinerea* in vitro // Gene. 2020. V. 759. P. 145002. doi: 10.1016/j.gene.2020.145002
12. Nuzhnaya T., Veselova S., Burkhanova G., Rumyantsev S., Shoeva O., Shein M., Maksimov I. Novel sources of resistance to *Stagonosporanodorum* and role of effector-susceptibility gene interactions in wheat of russian breeding // Int. J. Plant Biol. 2023a. V. 14. P. 377–396. doi: 10.3390/ijpb14020031
13. Nuzhnaya T., Veselova S., Burkhanova G., Maksimov I. Virulence factors of the fungal pathogen *Stagonosporanodorum* manipulate hormonal signaling pathways in *Triticum aestivum* L. by regulating host plant microRNA expressions // Front. Biosci. (Elite Ed) 2023b. V. 15(4). P. 22. doi: 10.31083/j.fbe1504022

14. Song X.-S., Gu K.-X., Duan X.-X., Xiao X.-M., Hou Y.-P., Duan Y.-B., Wang J.-X., Yu N, Zhou M.-G. Secondary amplification of siRNA machinery limits the application of spray-induced gene silencing // Mol Plant Pathol. 2018. V.19(12). P.2543–2560. doi: 10.1111/mpp.12728

15. Tan K-C., Oliver R.P. Regulation of proteinaceous effector expression in phytopathogenic fungi // PLoS Pathog. 2017. V. 13(4). e1006241. doi: 10.1371/journal.ppat.1006241

16. Yang X., Zhang L., Yang Y., Schmid M., Wang Y. miRNA Mediated regulation and interaction between plants and pathogens // International Journal of Molecular Sciences. 2021. V. 22. P. 2913. doi: 10.3390/ijms22062913

17. Zhang T., Zhao Y.-L., Zhao J.-H., Wang S., Jin Y., Chen Z.-Q., Fang Y.-Y., Hua C.-L., Ding S.-W., Guo H.-S. Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen // Nat Plants. 2016. V. 2 (10). doi: 10.1038/nplants.2016.153

References

1. Ding T., Li W., Li F., Ren M., Wang W. microRNAs: Key Regulators in plant responses to abiotic and biotic stresses via endogenous and cross-kingdom mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 2024. V. 25. P. 1154. doi: 10.3390/ijms25021154

2. Dubrovina A.S., Aleynova O.A., Suprun A.R., Ogneva Z.V., Kiselev K.V. Transgene suppression in plants by foliar application of in vitro-synthesized small interfering RNAs. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020. V. 104. P. 2125–2135. doi: 10.1007/s00253-020-10355-y

3. Dubrovina A.S., Kiselev K.V. Exogenous RNAs for gene regulation and plant resistance. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 2282. doi: 10.3390/ijms20092282

4. Peters Haugrud A.R., Zhang Z., Friesen T.L., Faris J.D. Genetics of resistance to *Septoria nodorum* blotch in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 2022. V. 135. V. 3685–3707. doi: 10.1007/s00122-022-04036-9

5. Huang C.Y., Wang H., Hu P., Hamby R., Jin H. Small RNAs - Big players in plant-microbe interactions. *Cell Host & Microbe*. 2019. V. 26. P. 173–182. doi: 10.1016/j.chom.2019.07.021

6. Jiao J., Peng D. Wheat microRNA1023 suppresses invasion of *Fusarium graminearum* via targeting and silencing FGSG_03101. *J. Plant Interact*. 2018. V. 13. P. 514–521. doi: 10.1080/17429145.2018.1528512

7. Jiang C.H., Li Z.J., Zheng L.Y., Yu Y.Y., Niu D.D. Small RNAs: Efficient and miraculous effectors that play key roles in plant-microbe interactions. *Molecular Plant Pathology*. 2023. V. 24. P. 999–1013. doi: 10.1111/mpp.13329

8. 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. V. 10. P. 892. doi: 10.3389/fpls.2019.00892

9. Koch A., Kumar N., Weber L., Keller H., Imani J., Kogel K.-H. Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14α-demethylase-encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013. V.110. P. 19324–19329. doi: 10.1073/pnas.1306373110

10. Mahanty B., Mishra R., Joshi R.K. Cross-kingdom small RNA communication between plants and fungal phytopathogens-recent updates and prospects for future agriculture. *RNA BIOLOGY*. 2023. V. 20. №. 1. P. 109–119. doi: 10.1080/15476286.2023.2195731

11. Meng X., Jin W., Wu F. Novel tomato miRNA miR1001 initiates cross-species regulation to suppress the conidiospore germination and infection virulence of *Botrytis cinerea in vitro*. *Gene*. 2020. V. 759. P. 145002. doi: 10.1016/j.gene.2020.145002

12. Nuzhnaya T., Veselova S., Burkhanova G., Rumyantsev S., Shoeva O., Shein M., Maksimov I. Novel sources of resistance to *Stagonospora nodorum* and role of effector-susceptibility gene interactions in wheat of russian breeding. *Int. J. Plant Biol*. 2023a. V. 14. P. 377–396. doi: 10.3390/ijpb14020031

13. Nuzhnaya T., Veselova S., Burkhanova G., Maksimov I. Virulence factors of the fungal pathogen *Stagonospora nodorum* manipulate hormonal signaling pathways in *Triticum aestivum* L. by regulating host plant microRNA expressions. *Front. Biosci. (Elite Ed)* 2023b. V. 15(4). P. 22. doi: 10.31083/j.fbe1504022

14. Song X.-S., Gu K.-X., Duan X.-X., Xiao X.-M., Hou Y.-P., Duan Y.-B., Wang J.-X., Yu N, Zhou M.-G. Secondary amplification of siRNA machinery limits the application of spray-induced gene silencing. *Mol Plant Pathol.* 2018. V. 19(12). P.2543–2560. doi: 10.1111/mpp.12728

15. Tan K-C., Oliver R.P. Regulation of proteinaceous effector expression in phytopathogenic fungi. *PLoS Pathog*. 2017. V. 13(4). e1006241. doi: 10.1371/journal.ppat.1006241

16. Yang X., Zhang L., Yang Y., Schmid M., Wang Y. miRNA Mediated regulation and interaction between plants and pathogens. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021. V. 22. P. 2913. doi: 10.3390/ijms22062913

17. Zhang T., Zhao Y.-L., Zhao J.-H., Wang S., Jin Y., Chen Z.-Q., Fang Y.-Y., Hua C.-L., Ding S.-W., Guo H.-S. Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen. *Nat Plants*. 2016. V. 2 (10). doi: 10.1038/nplants.2016.153