

# ХОЗЯИН-ИНДУЦИРОВАННЫЙ САЙЛЕНСИНГ ГЕНОВ (HIGS) В ПАТОСИСТЕМЕ ПШЕНИЦА-FUSARIUM CULMORUM: МОДИФИКАЦИЯ ВЕКТОРА ШТРИХОВАТОЙ МОЗАИКИ ЯЧМЕНЯ (BSMV)

## HIGS IN WHEAT-FUSARIUM CULMORUM PATHOSYSTEM: MODIFICATION OF BARLEY STRIPE MOSAIC VIRUS VECTOR

**P. Tretiakova  
A. Soloviev**

**Summary.** Host-induced gene silencing (HIGS) has been shown to be an effective tool when studying interactions between pathogens and crops. To study head blight on wheat caused by *Fusarium culmorum*,  $\gamma$ -vector of barley stripe mosaic virus (BSMV) was modified so it carried the fragment of the *tri5* gene enabling dsRNA-mediated transient silencing. Capped viral RNAs were synthesized to perform an infection of young wheat plants. The infection efficiency by virus/viral construct amounted to 98%. Application of the  $\gamma$ -PDS vector resulted in colorless stripes and areas on plant leaves proving the effectiveness of the silencing machinery. The  $\gamma$ -TRI5 vector was developed to test the aggressiveness of *F. culmorum* while suppressing its ability to produce trichothecene mycotoxins that are a potential virulence factor on wheat.

**Keywords:** head blight, virus, wheat, BSMV, VIGS, HIGS, *Fusarium culmorum*, *tri5*, trichothecene mycotoxins, silencing, RNA interference, dsRNA, transient expression, pathosystem, infection.

**Третьякова Полина Яковлевна**

Аспирант, ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К. А. Тимирязева»  
(г. Москва)

polina.tretiakova@yandex.ru

**Соловьёв Александр Александрович**

Д.б.н., ФГБНУ «ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии» (г. Москва)

a.soloviev70@gmail.com

**Аннотация.** К настоящему времени система сайленсинга, индуцированная растением-хозяином (HIGS), зарекомендовала себя как эффективный метод исследования взаимодействия между патогенными микроорганизмами и сельскохозяйственными культурами. Для изучения фузариоза колоса пшеницы, вызываемого грибом *Fusarium culmorum*, разработан  $\gamma$ -вектор вируса штриховатой мозаики ячменя, используемый для синтеза дцРНК транзистентно и несущий в себе фрагмент последовательности гена *tri5*. Был проведён синтез экированных вирусных молекул РНК и заражение молодых растений пшеницы. Эффективность заражения вирусом/вирусной конструкцией составила 98%. Использование вектора  $\gamma$ -PDS привело к возникновению обесцвеченных участков на листьях растений, что говорит об активности системы сайленсинга. Использование вектора  $\gamma$ -TRI5 направлено на изучение агрессивности гриба *F. culmorum* при отрицательном влиянии на его способность синтезировать трихотеценовые микотоксины, которые, могут являться фактором вирулентности на пшенице.

**Ключевые слова:** фузариоз колоса, вирус, пшеница, BSMV, VIGS, HIGS, *Fusarium culmorum*, *tri5*, трихотеценовые микотоксины, сайленсинг, РНК-интерференция, дцРНК, транзистентная экспрессия, патосистема, заражение.

## Введение

**Ф**узариоз колоса по сей день остаётся одним из наиболее серьёзных заболеваний в сельском хозяйстве. Он поражает широкий ряд культур, быстро распространяется и загрязняет растительную продукцию ядовитыми микотоксинами. Среди грибов, относящихся к роду *Fusarium*, одним из наиболее распространённых на территории Московской области является *Fusarium culmorum*. Механизм взаимодействия между грибом и растением-хозяином крайне сложный и, по-видимому, значительно различается среди сельскохозяйственных культур [1]. Однако, тот факт, что *F. culmorum* синтезирует большое количество трихотеценовых микотоксинов [2], заставляет задуматься о том, какую пользу они ему приносят. Одной из выдвинутых

гипотез является направленное действие трихотеценов против иммунитета растений [1, 2]. Иными словами, вероятно, что *F. culmorum* использует трихотеценовые микотоксины как инструмент, замедляющий или ослабляющий защитные механизмы растений, позволяя патогену эффективнее поражать культуры. В связи с этим, мы задались вопросом, можно ли контролировать распространение *F. culmorum* на пшенице, манипулируя способностью гриба синтезировать трихотецены.

Для осуществления этой цели использовали механизм РНК-интерференции, который зарекомендовал себя как эффективный способ изучения функции отдельных генов и определения потенциально важных сельскохозяйственных признаков культур. Сущность данного метода заключается в использовании молеку-

лы двуцепочечной РНК (дцРНК), которая индуцирует цепочку реакций, приводящих к снижению активности соответствующего гена [3]. В живых организмах РНК-интерференция играет важнейшую роль в регуляции экспрессии генов и имеет еще одно название — пост-транскрипционный сайленсинг генов [4]. Как уже было сказано ранее, началом РНК-интерференции является попадание в клетку дцРНК, которая в свою очередь незамедлительно распознаётся ферментом Dicer. Dicer разрезает дцРНК на более короткие молекулы, которые представляют собой также двуцепочечные структуры и носят название малые интерферирующие РНК (миРНК) или микроРНК, размер которых составляет 20–25 п.н. Далее двуцепочечные короткие молекулы включаются в состав комплекса RISC (RNA-induced silencing complex — РНК-индуцируемый сайленсинговый комплекс), активируя его, что впоследствии приводит к раскручиванию двуцепочечной молекулы и формированию антисмысловой цепи, при этом смысловая цепь деградируется. RISC в свою очередь также содержит белок Argonaute, обладающий эндонуклеазной активностью по отношению к мРНК, которая комплементарна антисмысловой цепи РНК, включённой в RISC. В результате белок Argonaute, имея короткий участок связывания с РНК, расщепляет мРНК, что препятствует дальнейшей трансляции и формированию функционального продукта гена [5, 6, 7]. Важно понимать, что РНК-интерференция снижает экспрессию гена, но не полностью «выключает» его, и уровень снижения экспрессии гена напрямую зависит от концентрации соответствующей дцРНК [3].

РНК-индуцированный сайленсинг генов особенно интересен для снижения экспрессии генов в полиплоидных организмах, поскольку копии гена, представленные в любом количестве, будут являться мишенью сайленсинга, если гомология между ними и дцРНК составляет хотя бы 85% [8]. Особенно важно это при изучении устойчивости гексаплоидной мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*), которая является ценной сельскохозяйственной культурой и поражается рядом серьезных заболеваний. Здесь важно добавить, что помимо избыточности генетического материала пшеницы, связанной с её плоидностью, сам геном культуры чрезвычайно большой. Так, геном пшеницы содержит примерно 16000 Мб ДНК, что в 128 раз больше, чем у модельной культуры *Arabidopsis thaliana* [9].

Несмотря на достижения международного исследовательского консорциума IWGSC (International Wheat Genome Sequencing Consortium) по картированию генома пшеницы, требуется разработка новых инструментов генетического анализа для описания последовательностей защитных реакций культуры против действия различных патогенов, в частности фузариозных грибов.

Для снижения концентрации трихотеценовых микотоксинов, производимых грибом *F. culmorum*, было решено снизить экспрессию гена *tri5*. Данный ген кодирует фермент триходиенсинтазу, который катализирует первый этап биосинтеза трихотеценов [2]. Таким образом, снижение уровня триходиенсинтазы должно нарушить всю цепь синтеза данных соединений. Была синтезирована дцРНК, комплементарная гену *tri5*, с целью её внесения в жидкую питательную среду при культивировании *F. culmorum*. В результате было получено значительное снижение экспрессии гена *tri5* и концентрации трихотеценов (данные не представлены).

Следующим этапом является проведение эксперимента непосредственно на культуре (*in planta*). Поскольку генетическая трансформация пшеницы представляет собой крайне сложный и времязатратный процесс, в опыте использован механизм, при котором синтез двуцепочечной РНК происходил в организме пшеницы транзигентно, с помощью вирусных векторов. Для этого была выбрана система BSMV (barley stripe mosaic virus — вирус штриховатой мозаики ячменя).

Вирус-индуцированный сайленсинг генов (virus-induced gene silencing — VIGS) давно используется в различных генетических исследованиях как на двудольных, так и на однодольных культурах. В начальной или «шоковой» стадии заражения появляются интенсивные симптомы и происходит быстрое развитие вируса в организме. Но по мере того, как активируются защитные механизмы растения-хозяина, инфекция переходит в хроническую фазу, характеризующуюся сниженной симптоматикой и низким содержанием вируса [10].

Геном BSMV состоит из трёх РНК —  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ . Каждая из этих РНК имеет метилированный кэп на 5'-конце и полиаденилированную последовательность на 3'-конце, после которой следует тирозин-акцепторная тРНК-подобная структура. РНК  $\alpha$  кодирует метилтрансферазу/хеликазную субъединицу РНК-зависимой РНК-полимеразы (РзРп). РНК  $\beta$  кодирует белок оболочки и три основных белка тройного блока генов (*TGB1*, *TGB2* и *TGB3*), которые необходимы для передвижения вируса от клетки к клетке. РНК  $\gamma$  кодирует полимеразную субъединицу РзРп и белка  $\gamma\text{b}$ , который играет значительную роль в вирусном патогенезе, передвижении на большие расстояния и подавлении защитных реакций растения-хозяина против сайленсинга [11, 10].

В данной работе каждая мРНК была представлена в качестве своей кДНК копии под контролем промотора T7-РНК-полимеразы. Holzberg с соавторами (2002) модифицировали  $\gamma$ -вектор таким образом, что целевая последовательность, призванная подавить экспрессию соответствующего гена была встроена после открытой

рамки считывания (ОРС) последовательности, кодирующей белок  $\psi$ . Целевая последовательность может быть встроена в вектор в прямом (смысловом) или обратном (антисмысловом) направлении. Для того, чтобы предупредить влияние встраиваемой последовательности на активность белка  $\psi$ , при конструкции вектора после последовательности  $\psi$  был помещён стоп-кодон, благодаря которому встраиваемая последовательность не может быть транслирована *in planta*.

Одним из важных этапов использования BSMV-системы является способ доставки РНК в организм культуры или, иными словами, непосредственное заражение. На данный момент их существует несколько. Самый ранний — это заражение с помощью втирания в лист растения смеси РНК. Как правило, для этого используется специальный буфер, в состав которого входят твердые острые частицы, например бентонита. При втирании эти частицы повреждают поверхность листа и позволяют вирусным РНК проникнуть внутрь клетки. Данный метод является времязатратным и дорогим, поскольку требует синтеза экпированных РНК [11, 12, 13]. Для экономии денег иногда используется растение-посредник, выполняющее роль источника инокулюма.

В дальнейшем была разработана система, при которой использовались плазмиды, содержащие в себе двойной 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты (Cauliflower mosaic virus — CaMV) непосредственно перед кДНК вирусных РНК и последовательности рибозима вируса гепатита дельта сразу после кДНК. Данные плазмиды доставляются в клетки растения с помощью биобалистики. Тем не менее, минусом данной системы является потенциальная нестабильность вставки. К тому же клонирование нескольких целевых генов может занимать большое количество времени [10, 14].

Новейшей методикой является использование *Agrobacterium tumefaciens* для доставки BSMV-векторов. Такая система была впервые предложена Yuan с соавторами (2011). В этом случае штаммы бактерии несут в себе последовательность кДНК вирусных РНК в Ti-плазмиде. При конструкции таких векторов последовательность кДНК вирусных РНК была помещена между двойным 35S-промотором и последовательностью рибозима сателлитной РНК вируса кольцевой пятнистости табака. Был также добавлен сайт безлигазного клонирования, позволяющий проводить более эффективное клонирование целевой последовательности гена.

BSMV-система была использована на ячмене (*Hordeum vulgare*) и позже на пшенице (*Triticum aestivum*) для подавления экспрессии генов в самих культурах. Так, например, вектор  $\psi$ -PDS был создан для сайленсинга фитоендесатуразы (PDS — phytoene

desaturase). Данный фермент необходим для синтеза каротиноидов, соединений, защищающих хлорофилл от обесцвечивания. Ячмень, заражённый системой BSMV, экспрессирующей фрагмент PDS, выделенный из самого ячменя, риса или пшеницы, имел обесцвеченные участки, подтверждая эффективность системы и протекание сайленсинга [11, 12, 10]. Вектор  $\psi$ -PDS часто используется в исследованиях с применением BSMV как контроль эффективности сайленсинга, т.к. появляющиеся обесцвеченные участки сильно отличаются от симптомов вируса штриховатой мозаики ячменя и говорят об активности системы.

Использование системы BSMV включает также исследования по функциональной геномике на двудольных и однодольных растениях, таких как ячмень [15, 16, 17], пшеница [9, 18, 19], имбирь [20] и др., и изучение взаимодействия между патогеном и растением. Целью этих исследований было получение растений с выраженным фенотипом, изучение процесса их морфогенеза и анализ защитных реакций в ответ на различные стрессовые условия, включая оценку генов устойчивости.

Scofield с соавторами (2005) использовали систему VIGS для анализа функций генов, принимающих участие в формировании устойчивости пшеницы к листовому ржавчине, в основе которой лежит активность гена *Lr21*. Было продемонстрировано, что применение BSMV-конструкции, несущей в себе фрагмент последовательности *Lr21* размером 150 п.н., отрицательно повлияло на устойчивость пшеницы к ржавчине, при этом использование контрольной конструкции никак не отразилось на восприимчивости культуры. Кроме того, подавление экспрессии генов *rar1*, *sgt1* и *hsp90*, принимающих участие во многих цепях защитных реакций в различных культурах, также привело к ухудшению устойчивости пшеницы, подтверждая их значение в иммунном ответе растения на заражение.

Wang с соавторами (2011) изучали влияние белка теплового шока-90 (HSP90) на развитие и устойчивость пшеницы к различным стрессам. Были изолированы группы гомологичных генов, кодирующих три типа HSP90. Использование VIGS для подавления экспрессии одного из генов (*TaHsp90.1*) привело к значительному снижению роста молодых растений пшеницы, в то время как сайленсинг *TaHsp90.2* или *TaHsp90.3* отрицательно отразился на гиперчувствительной защитной реакции культуры на инокуляцию грибом-возбудителем жёлтой ржавчины.

Geng с соавторами (2013) анализировали функции кальций-зависимых протеинкиназ (Calcium-dependent protein kinase — CPK) в устойчивости пшеницы к различным стрессам, в ответ на которые происходит актива-

ция фермента ТаСРК2. При этом подавление экспрессии ТаСРК2 с помощью VIGS привело к потере устойчивости культуры у толерантных линий при заражении *Blumeria graminis tritici*.

Ни с соавторами (2009) доказали с помощью BSMV, что хоризматсинтаза, (HvCS), субединица-2  $\alpha$ -антранилатсинтазы (HvASa2) и хоризматмутаза-1 (HvCM1), участвующие в синтезе ароматических аминокислот в ячмене, положительно влияют на устойчивость культуры к возбудителю мучнистой росы *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*.

В настоящее время большую популярность набирает такое направление, как сайленсинг, индуцированный растением-хозяином (HIGS — host-induced gene silencing). Одной из его разновидностей выступает VIGS, другой — генетически трансформированные растения. Сущность HIGS заключается в том, что в организме растения происходит синтез молекулы дцРНК (транзистентно или стабильно), действующей против определённого гена патогена, способного повлиять на его жизнедеятельность.

В случае с VIGS последовательность целевого гена патогена клонируется в BSMV  $\gamma$ -вектор, причём не требуется использование длинных последовательностей, и их размер может составлять от 150 п.н. [11, 12, 13].

Недавние исследования касательно HIGS основываются на поиске альтернативных средств защиты растений. Было продемонстрировано, что HIGS может быть применим против нематод [23], некоторых насекомых [24], паразитических растений [25], микроскопических грибов и оомицетов [3, 26, 27, 28, 29]. С помощью BSMV на пшенице Chen с соавторами (2016) подавили синтез хитинсинтазы III в грибе *F. culmorum*, (отвечает за биосинтез клеточной стенки гриба) и P450 ланостерол-деметилазы (катализирует ключевую стадию биосинтеза эргостерола). Помимо этого, ими были получены трансгенные линии пшеницы, которые так же, как и линии, синтезирующие дцРНК транзистентно, характеризовались значительно меньшей восприимчивостью к фузариозу колоса.

Путь, по которому происходит поглощение дцРНК патогеном, пока остаётся неизвестным. Однако некоторые исследования поднимают вопрос о существовании некоего эволюционного консервативного механизма коммуникации между клетками через молекулы РНК [30].

Согласно имеющейся к настоящему моменту информации о механизмах сайленсинга, возможно, обмен интерфирующими молекулами между взаимодействующими организмами является вполне естественным

процессом [30]. В организме гриба *Botrytis cinerea* были обнаружены эффекторы на основе РНК, которые действуют против транскриптов, играющих роль в защитных реакциях растения [31]. Был описан оомицет *Phytophthora sojae*, который экспрессировал супрессоры РНК-интерференции в растении *Nicotiana bentaminiana* и сое [32].

В целом механизм HIGS показал себя как очень эффективное средство в борьбе с болезнями и вредителями. Кроме того, его использование ставит под сомнение применение фунгицидов, которые помимо того, что опасны для здоровья и окружающей среды, со временем становятся неэффективными из-за эволюции патогенов [3]. Однако насколько далеко пойдёт использование HIGS в защите растений, сказать трудно, т.к. в большинстве стран существует запрет на выращивание трансгенной продукции, а использование рекомбинантного вируса чревато попаданием его в природу и должно находиться под строгим контролем в отведённых для этого специальных помещениях.

Для оценки влияния VIGS на развитие той или иной болезни большое значение имеет разработка методов заражения растений, причём сначала происходит инокуляция вирусом или вирусной конструкцией, за которой следует заражение самим патогеном. Длительность периода от одного заражения до другого зависит от культуры и изучаемого болезнетворного микроорганизма. Например, при изучении стеблевой ржавчины пшеницы, промежуток между двумя заражениями составляет 10 дней, при условии, что инокуляция вирусом была проведена на десятидневных проростках пшеницы [12, 13]. Считается, что инокуляцию вирусом можно проводить на любой стадии развития растения, но, как правило, используются именно молодые растения [13]. А при изучении болезней, поражающих колос, иногда необходимо дожидаться начала колошения, а в некоторых случаях более поздней стадии — цветения.

Следует отметить, что в данном исследовании выполнена модификация вектора BSMV только в научных целях для того, чтобы иметь возможность оценить влияние сайленсинга гена *tri5* на агрессивность *F. culmorum in planta*, исключив при этом долгий процесс генетической трансформации эмбрионов пшеницы.

## Материалы исследований

### Растительный материал

В эксперименте использовали два сорта мягкой пшеницы Злата и Иволга. Оба сорта выращивали в теплице при температуре 20–25 °С днём и 16–20 °С ночью, световом периоде день/ночь — 16/8 ч. Полив проводили один раз в 2–3 дня.

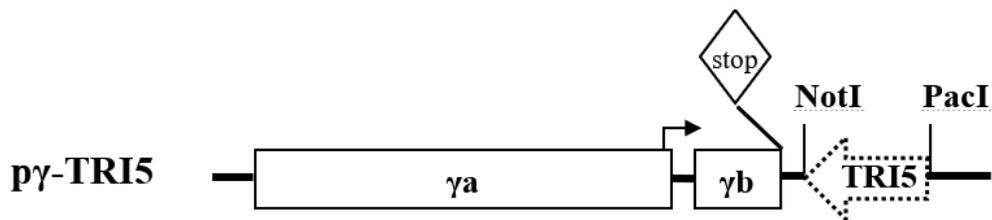


Рис. 1. Геномная организация РНК  $\gamma$ -TRI5

Субгеномные промотеры показаны стрелками, ориентация цепи *tri5* показана крупной стрелкой; стоп-кодон, представленный в виде ромба, необходим для того, чтобы исключить влияние вставки на активность белка  $\gamma$ b [11].

### Конструкция BSMV-вектора

Используемые в данном эксперименте вирусные векторы были получены из Northwest Agriculture and Forestry University (Янлин, КНР). Вектор  $\gamma$  был модифицирован таким образом, что включал в себя готовые сайты встраивания в соответствии с протоколом [11, 13].

Последовательность целевого гена, выбранного для проведения подавления его экспрессии была амплифицирована с помощью праймеров Fc-tri5-REN-fwr 5'-T-TTAATTAAGCTGGATTGAGCACTACAAC-3' и Fc-tri5-REN-rvs 5'-GGTG-GCGGCCGC-AACGGCTGTCGTGATTTC-3' из ДНК гриба *Fusarium culmorum*. Последовательности праймеров включали в себя соответствующие сайты рестрикции (*NotI* и *PacI*), необходимые для их узнавания рестриктазами. Размер последовательности составил примерно 200 п.н.

С помощью баз данных секвенированных последовательностей было установлено, что целевая последовательность является специфичной для грибов рода *Fusarium*.

После обработки последовательности ферментами рестрикции *NotI* и *PacI* полученный ампликон был встроен в *NotI/PacI* сайты  $\gamma$ -вектора с помощью лигазы. В результате была получена бессмысловая цепь, включающая в себя последовательность гена *tri5* гриба *Fusarium culmorum* (рис. 1). Полученный вектор был встроен в штамм бактерии *Escherichia coli* с помощью теплового шока.

Для подтверждения и определения эффективности заражения в качестве контроля использовали два вида модифицированного  $\gamma$ -вектора — вектор, несущий в себе природные последовательности вируса BSMV и вектор, включающий в себя последовательность гена PDS. Последний является удобным для мониторинга заражения, поскольку позволяет чётко проследить симптомы инфекции и пути распространения вируса в организме растения.

### Культивирование штаммов *E. coli*

Все штаммы, содержащие опытные вектора, культивировали на среде LB, содержащей антибиотик ампициллин в концентрации 50 микрог/мл. Поскольку при модификации  $\gamma$ -вектора с помощью последовательности гена *tri5* изменяли только участок между сайтами рестрикции *NotI* и *PacI*, не проводя никаких дополнительных манипуляций с геном устойчивости к антибиотикам, не было возможным визуально отличить колонии с целевой *tri5*-последовательностью от колоний с первичным вектором. Поэтому для отбора колоний с трансформированным вектором проводили ПЦР-колоний с праймерами Fc-tri5-REN-fwr и Fc-tri5-REN-rvs. Полученная конструкция была верифицирована с помощью ДНК-секвенирования.

### *In vitro* транскрипция вирусных РНК

Синтез *in vitro* транскриптов проводили с помощью HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit (New England Biolabs, U.S.A.) в соответствии с инструкциями, предложенными производителем.

Для того, чтобы РНК-транскрипты были достаточно стабильными при инокуляции растения необходимо защитить их от действия различных рестриктаз и обеспечить процесс их экпирования. Для синтеза вирусных РНК *in vitro* плазмидные ДНК, кодирующие геном вируса BSMV, были линейаризованы с помощью соответствующих ферментов рестрикции:

- ◆  $\rho\alpha$  — *MluI*;
- ◆  $\rho\beta$  — *SpeI*;
- ◆  $\rho\gamma$  — *MluI*;
- ◆  $\rho\gamma$ -Tri5 — *BssHII*;
- ◆  $\rho\gamma$ -PDS — *BssHII*.

### Инокуляция пшеницы вирусными РНК

Геном вируса BSMV состоит из трёх частей и для успешного заражения растений должны быть использованы все три РНК в одинаковом соотношении (1:1:1). Так,

Таблица 1. Последовательности праймеров

| Название | Прямой                     | Обратный                    |
|----------|----------------------------|-----------------------------|
| TRI5_A   | 5'-GTTTCATGCACGGCTACGTC-3' | 5'-TTGGCGTCTCTGTATCCTG-3'   |
| EF1A     | 5'-AGATTGGCGGTATTGGAACG-3' | 5'-TTGGAAGGAGCGAAGGTAAC-3'  |
| Ta54825  | 5'-TGACCGTATGAGCAAGGAG-3'  | 5'-CCAGACAACCTCGCAACTTAG-3' |
| pGamma   | 5'-TGATGATTCTTCTCCGTTGC-3' | 5'-TGGTTTCCAATTCAGGCATCG-3' |

в зависимости от варианта, были использованы следующие комбинации:

- ◆  $\alpha + \beta + \gamma$ ;
- ◆  $\alpha + \beta + \gamma$ -Tri5;
- ◆  $\alpha + \beta + \gamma$ -PDS.

Смесь соответствующих вирусных РНК была нанесена на полностью раскрывшиеся первый и второй листья 10-дневного растения пшеницы вместе с FES-буфером с помощью втирания. В состав FES-буфера входили: 77 мМ глицина, 60 мМ  $K_2HPO_4$ , 22 мМ  $Na_4P_2O_7 \times 10H_2O$ , 1% бентонита и 1%  $SiO_2$  [11]. После заражения растения были слегка обрызганы водой и оставлены в теплице до появления симптомов.

Примерно через 10 дней стали проявляться симптомы вируса штриховатой мозаики. Оценку инфекции проводили по шкале от 0 до 3, где 0 = симптомы отсутствуют, 1 = неотчетливые жёлтые полосы (штрихи) на листьях, 2 = светло-жёлтые штрихи на листьях и 3 = яркие жёлтые полосы.

#### Заражение пшеницы грибом *F. culmorum*

При наступлении периода цветения колос пшеницы был точно заражен конидиями гриба [1]. Десять мкл суспензии конидий ( $4 \times 10^4$  конидий/мл) были введены через колосковые чешуи в центральный цветок колоса пшеницы. После этого колос был слегка опрыскан водой и заключен в пластиковый пакет для поддержания влажности в течение трёх дней. Оценку уровня инфекции проводили визуально через 7, 12, 16 и 20 дней после заражения в соответствии с долей обесцвечивания колоса (%). На 20-й день зараженные колоса пшеницы были отобраны для выделения РНК и проведения ПЦР в режиме реального времени.

#### Выделение РНК и синтез кДНК

Выделение тотальной РНК проводили с помощью жидкого азота и Plant RNA Isolation Mini Kit (Agilent Technologies, U.S.A.). Все выделенные образцы РНК были обработаны ферментом ДНКаза I перед непосредственным синтезом кДНК. Отсутствие геномной ДНК в полученных образцах было подтверждено с помощью ПЦР в режиме реального времени. Первая цепь кДНК была

синтезирована с использованием RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., U.S.A.) согласно инструкциям производителей.

#### ПЦР в режиме реального времени

Последовательности праймеров, использованные для определения уровня подавления экспрессии гена *tri5* и количества *F. culmorum* в образцах, представлены в табл. 1.

Для нормализации количества РНК гена *tri5* в грибе *F. culmorum* был использован ген фактора трансляции элонгации (*EF1A*). Для количественного учета гриба *F. culmorum* в образцах, использовали соотношения транскриптов генов *EF1A* гриба и *Ta54825* (актин) пшеницы.

Пара праймера TRI5\_A, специфичных для гена *tri5* была подобрана таким образом, что амплификация целевого фрагмента происходила за пределами последовательности, используемой для подавления экспрессии гена *tri5*. Подбор праймеров проводили с помощью программного обеспечения Primer3 Input (<http://primer3.ut.ee/>).

ПЦР в режиме реального времени проводили с помощью SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit (Bioline, U.K.).

#### Результаты исследований

##### Идентификация целевого гена

Для проведения сайленсинга был выбран фрагмент гена *tri5* размером 200 п.н. Данный фрагмент гена является специфичным для рода *Fusarium* и не имеет гомологии с последовательностями геномов других организмов, представленных в общедоступных базах данных, в частности с геномом пшеницы, исключая, таким образом неспецифичный сайленсинг генов культуры. Благодаря экспериментам, проведенным нами ранее (данные не представлены) было установлено, что транскрипты гена *tri5* были представлены в зараженных фузариозом листьях сортов Злата и Иволга в высоком количестве. Было показано, что при заражении грибом растений идет стабильная экспрессия целевого гена в организме

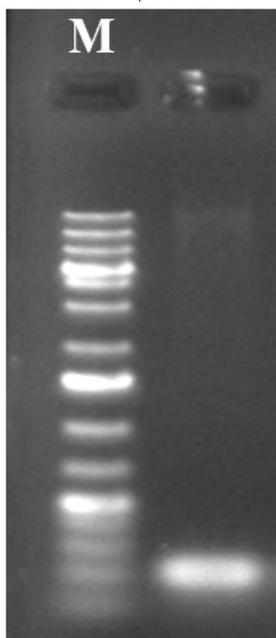


Рис. 2. Верификация целевой последовательности в трансформированном векторе  
М — 1 kb маркер, размер последовательности — 200 п.н.

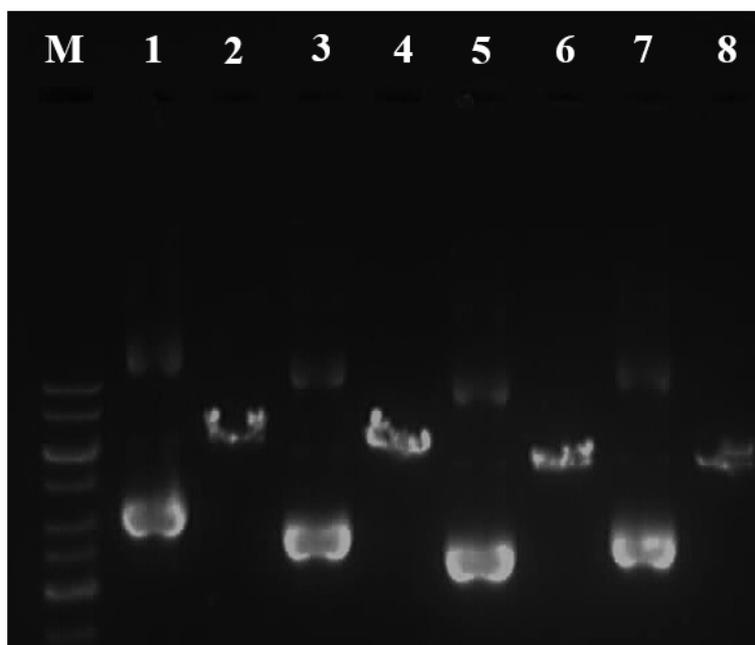


Рис. 3. Линеаризация плазмидных ДНК-векторов  
М — 1 kb Plus Маркер, 2 — р $\alpha$  нелианеризованная, 3 — р $\alpha$  лианеризованная, 4 — р $\beta$  нелианеризованная, 5 — р $\beta$  лианеризованная, 6 — р $\gamma$  нелианеризованная, 7 — р $\gamma$  лианеризованная, 8 — р $\gamma$ -Tri5 нелианеризованная, 9 — р $\gamma$ -Tri5 лианеризованная.

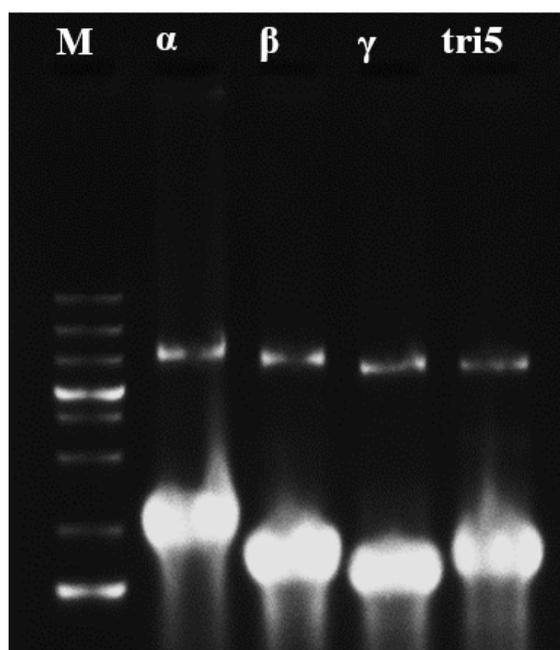


Рис. 4. Синтез р $\alpha$ , р $\beta$ , р $\gamma$ , р $\gamma$ -Tri5.  
М — 1 kb маркер

*F. culmorum*. Таким образом, ген *tri5* является подходящей мишенью для РНК-интерференции.

#### Клонирование целевой последовательности в $\gamma$ -вектор

Вирус штриховатой мозаики ячменя (barley stripe mosaic virus — BSMV) относится к гордеивирусам (*Hordeivirus* spp.) и имеет геном, состоящий из трех РНК —  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ . Векторы, используемые в данном эксперименте, содержат в себе полные последовательности кДНК молекул  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  с промотором гена Т7-полимеразы. Фрагмент *tri5* размером 200 п.н. был клонирован в модифицированный  $\gamma$ -вектор так, что для транскрипции использовалась антисмысловая цепь целевой вставки, поскольку было показано, что эффективность таких конструкций немного выше (рис 2).

#### Подготовка вирусных РНК

Для линейаризации плазмидных ДНК были взяты концентрации из расчета, что для заражения 20 растений необходимо подготовить 1 мкг каждого отдельного вида плазмиды. Успешность линейаризации была проверена на 2% агарозном геле (рис. 3).

В дальнейшем полученные образцы линейаризованных плазмид были использованы для синтеза кэпированных мРНК *in vitro*. Эффективность транскрипции была проверена на 2% агарозном геле (рис. 4). Тонкие бэнды

длиной 6000 п.н.— это оставшаяся в смеси ДНК-матрица. Жирные более короткие бэнды — это синтезированная РНК.

Важно отметить, что линейаризация плазмид является крайне важным этапом синтеза РНК. РНК-полимеразы являются высокоактивными ферментами и использование кольцевых молекул в качестве матрицы приведет к синтезу большого количества длинных гетерогенных транскриптов. Получение транскриптов определенной длины требует полной линейаризации молекул плазмидной ДНК.

#### Условия заражения пшеницы вирусом и грибом

Смесь соответствующих РНК в FES-буфере была нанесена на второй полностью раскрывшийся лист десятидневного проростка пшеницы с помощью втирания. Такой компонент буфера как бентонит обеспечивал разрыв тканей листа, позволяя вирусным РНК более эффективно проникать в клетки растения. Каждый вариант заражения включал в себя три вирусных транскрипта, состоящих из  $\alpha$ -,  $\beta$ -РНК и одной из следующих РНК —  $\gamma$  (природный вирус),  $\gamma$ -Tri5 (рекомбинантная РНК, используемая для подавления экспрессии *tri5*), и  $\gamma$ -PDS (рекомбинантная РНК, используемая для подавления синтеза фитоендесатуразы), используемая в качестве контроля. Эффективность заражения вирусом/вирусными конструкциями была достаточно высокой, составив 98%. Результаты заражения пред-

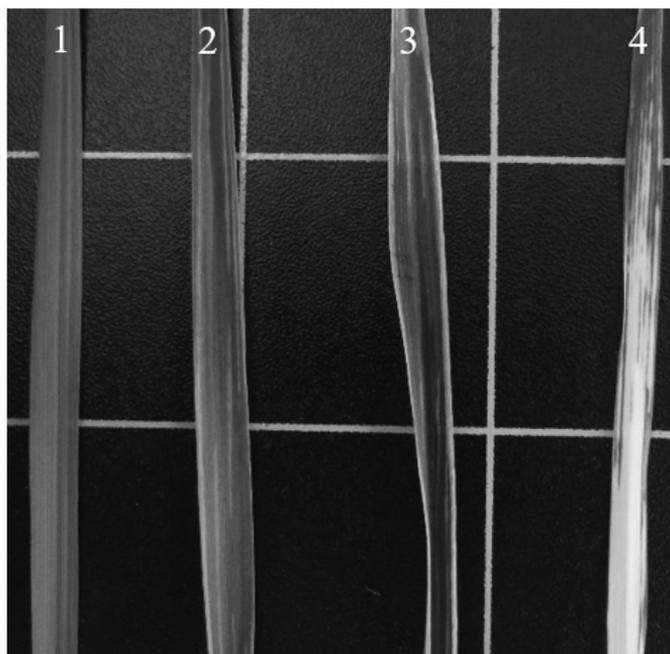


Рис. 5. Заражение сорта Злата вирусом и вирусными конструкциями. Листья пшеницы через 10–12 дней после заражения; 1 — отрицательный контроль, 2 — BSMV-Tri5, 3 — пустой вектор, 4 — BSMV-PDS.

ставлены на рис. 5. Так, варианты 2 и 3 имеют желтые штрихи на листьях, что говорит об эффективном заражении естественным и рекомбинантным вирусом. В варианте 4 образовывались штрихи белого цвета, а в некоторых случаях и целые обесцвеченные участки, служащие подтверждением подавления синтеза фитоендесатуразы. Как было сказано ранее, фитоендесатураза принимает участие в цепи формирования зеленого пигмента (хлорофилла), поэтому появление обесцвеченных областей на листе является прямым подтверждением сайленсинга и стабильной работы всей системы.

В предыдущих исследованиях дальнейшее заражения растений грибным патогеном следовало через 10–14 дней после заражения вирусом, но эти работы, в большинстве своем, ориентировались на разные виды ржавчин, которые также поражают листья и стебли злаковых. В нашем случае было принято изменить время заражения грибом *F. culmorum*, который, поражает пшеницу в период ее наибольшей восприимчивости — в момент цветения. Было решено отложить заражение грибом до наступления данной фазы, значительно увеличивая, таким образом, разрыв между первым и вторым заражением. Крайне важно в этом случае поддерживать определенный температурный режим и влажность помещения, регулярно проводить полив и подкормку растений.

Эффективность заражения грибом была подтверждена визуально, по наличию характерного обесцвечивания колоса и, в некоторых случаях, мицелия гриба и с помощью ПЦР в режиме реального времени. Дополнительно отмечено, что развитие фузариоза, в вариантах, зараженных рекомбинантным вирусом  $\gamma$ -Tri5, было значительно замедлено (данные не представлены). Однако, на данный момент, нельзя точно утверждать, что вызвало такую реакцию. На это могли оказать влияние как сайленсинг *tri5* и, соответственно, недостаточный синтез трихотеценовых микотоксинов, позволяющих ослабить организм пшеницы, так и присутствие вируса/вирусной конструкции, которое могло активировать дополнительные защитные реакции и отрицательно сказаться на жизнедеятельности *F. culmorum*.

#### Заключение

В ходе исследования был получен вектор, несущий в себе последовательность гена *tri5*, необходимый для синтеза соответствующей РНК и дальнейшего заражения растений пшеницы. С помощью T7-РНК-полимеразы были синтезированы кэпированные РНК  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ , смесь которых была использована для заражения растений. Эффективность заражения пшеницы вирусом штриховатой мозаики ячменя и вирусной конструкцией составила 98% и была подтверждена визуально и с помощью ПЦР в режиме реального времени.

Способность смеси вирусных РНК индуцировать сайленсинг генов *in planta* доказана в варианте с  $\gamma$ -PDS, где отчётливо видны зоны обесцвечивания, появляющиеся в результате снижения уровня биосинтеза фермента фиоендесатуразы.

Несмотря на то, что заражение растений конидиями гриба *F. culmorum* прошло успешно, и, визуальная оценка развития фузариоза колоса совпала с ожидаемыми результатами, данные, полученные при проведении ПЦР в режиме реального времени, были неоднозначными.

## ЛИТЕРАТУРА

- Maier F.J., Miedaner T., Haderl B., Felk A., Salomon S., Lemmens M., Kassner H., Schaefer W. Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (Tri5) gene in three field isolates of different chemotype and virulence // *Molecular Plant Pathology*. — 2006. — Vol. 7. — № 6. — P. 449–461.
- Wagacha J.M., Muthomi J.W. *Fusarium culmorum*: infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat // *Crop Protection*. — 2007. — № 26. — P. 877–885.
- Koch A., Kumar N., Weber L., Keller H., Imani J., Kogel K.-H. Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 alphasdemethylase-encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2013. — P. 19324–19329.
- Vaucheret H., Béclin C., Fagard M. Post-transcriptional gene silencing in plants. // *J Cell Sci*. — 2001. — № 114 — P. 3083–3091.
- Baulcombe D. RNA silencing in plants // *Nature*. — 2004. — № 431. — P. 356–363.
- Vaucheret H., Vazquez F., Crété P., Bartel D.P. The action of Argonaute1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development // *Genes Dev*. — 2004. — № 18. — P. 1187–1197.
- Brodersen P., Voinnet O. The diversity of RNA silencing pathways in plants // *Trends Genet*. — 2006. — № 22. — P. 268–280.
- Thomas C.L., Jones L., Baulcombe D. C., Maule A. J. Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector // *Plant J*. — 2001. — № 25. — P. 417–425.
- Scofield S.R., Huang L., Brandt A. S., Gill B. S. Development of a virus-induced gene-silencing system for hexaploid wheat and its use in functional analysis of the Lr21-mediated leaf rust resistance pathway // *Plant Physiology*. — 2005. — № 138. — P. 2165–2173.
- Yuan C., Li C., Yan L., Jackson A. O., Liu Z., Han C., Yu J., Li D. A high throughput Barley stripe mosaic virus vector for virus-induced gene silencing in monocots and dicots // *PLoS ONE*. — 2011. — Vol. 6. — № 10. — P. 1–16.
- Holzberg S., Brosio P., Gross C., Pogue G. P. Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant // *Plant J*. — 2002. — № 30. — P. 315–327.
- Yin C.T., Jurgenson J. E., Hulbert S. H. Development of a host-induced RNAi system in the wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2011. — № 24. — P. 554–561.
- Huang L. BSMV-Induced Gene Silencing Assay for Functional Analysis of Wheat Rust Resistance // *Wheat Rust Diseases Methods and Protocols*. — 2017. — P. 257–264.
- Lee W.-S., Rudd J.J., Kanyuka K. Virus induced gene silencing (VIGS) for functional analysis of wheat genes involved in *Zymoseptoria tritici* susceptibility and resistance // *Fungal Genetics and Biology*. — 2015. — № 79. — P. 84–88
- Hein I., Barciszewska-Pacak M., Hrubikova K., Williamson S., Dinesen M. et al. Virus-induced gene silencing-based functional characterization of genes associated with powdery mildew resistance in barley // *Plant Physiol*. — 2005. — № 138. — P. 2155–2164.
- Hu P., Meng Y., Wise R. P. Functional contribution of chorismate synthase, anthranilate synthase, and chorismate mutase to penetration resistance in barley–powdery mildew interactions // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2009. — № 22. — P. 311–320.
- Meng Y., Moscou M. J., Wise R. P. Blufensin1 negatively impacts basal defense in response to barley powdery mildew // *Plant Physiology*. — 2009. — № 149. — P. 271–285.
- Zhou H., Li S., Deng Z., Wang X., Chen T. et al. Molecular analysis of three new receptor-like kinase genes from hexaploid wheat and evidence for their participation in the wheat hypersensitive response to stripe rust fungus infection // *Plant J*. — 2007. — № 52. — P. 420–434.
- Campbell J., Huang L. Silencing of multiple genes in wheat using Barley stripe mosaic virus // *J Biotech Res*. — 2010. — № 2. — P. 12–20.
- Renner T., Bragg J., Driscoll H. E., Cho J., Jackson A. O. et al. Virus-induced gene silencing in the culinary ginger (*Zingiber officinale*): An effective mechanism for down-regulating gene expression in tropical monocots // *Mol Plant*. — 2009. — № 2. — P. 1084–1094.
- Wang G.-F., Wei X., Fan R., Zhou H. et al. Molecular analysis of common wheat genes encoding three types of cytosolic heat shock protein 90 (Hsp90): functional involvement of cytosolic Hsp90s in the control of wheat seedling growth and disease resistance // *New Phytol*. — 2011. — № 191. — P. 418–431.
- Geng S., Li A., Tang L., Yin L., Wu L. et al. TaCPK2-A, a calcium-dependent protein kinase gene that is required for wheat powdery mildew resistance enhances bacterial blight resistance in transgenic rice // *J. Exp. Bot*. — 2013. — № 64. — P. 3125–3136.
- Huang G.Z., Allen R., Davis E. L., Baum T.J., Hussey R. S. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2006. — P. 14302–14306.
- Mao Y.B., Cai W. J., Wang J. W., Hong G. J., Tao X. Y., Wang L. J., Huang Y. P., Chen X. Y. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol // *Nature Biotechnology*. — 2007. — № 25. — P. 1307–1313.
- Roney J.K., Khatibi P. A., Westwood J. H. Cross-species translocation of mRNA from host plants into the parasitic plant dodder // *Plant Physiology*. — 2007. — № 143. — P. 1037–1043.

26. Panwar V., McCallum B., Bakkeren G. Endogenous silencing of *Puccinia triticina* pathogenicity genes through in planta-expressed sequences leads to the suppression of rust diseases on wheat // *The Plant Journal*. — 2013. — № 73. — P. 521–532.
27. Pliego C., Nowara D., Bonciani G. et al. Host-induced gene silencing in barley powdery mildew reveals a class of ribonuclease-like effectors // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2013. — № 26. — P. 633–642.
28. Baulcombe D.C. VIGS, HIGS and FIGS: small RNA silencing in the interactions of viruses or filamentous organisms with their plant hosts // *Current Opinion in Plant Biology*. — 2015. — № 26. — P. 141–146.
29. Cheng W., Song X-S., Li H-P. et al. Host-induced gene silencing of an essential chitin synthase gene confers durable resistance to *Fusarium* head blight and seedling blight in wheat // *Plant Biotechnology Journal*. — 2015. — № 13. — P. 1335–1345.
30. Chen W., Kastner C., Nowara D. et al. Host-induced silencing of *Fusarium culmorum* genes protects wheat from infection // *Journal of Experimental Botany*. — 2016. — Vol. 67. — № 17. — P. 4979–4991.
31. Weiberg A., Wang M., Lin F.M., Zhao H.W., Zhang Z.H., Kaloshian I., Huang H.D., Jin H.L. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways // *Science*. — 2013. — № 342. — P. 118–123.
32. Qiao Y.L., Liu L., Xiong Q. et al. Oomycete pathogens encode RNA silencing suppressors // *Nature Genetics*. — 2013. — № 45. — P. 330–333.

© Третьякова Полина Яковлевна ( polina.tretyakova@yandex.ru ), Соловьёв Александр Александрович ( a.soloviev70@gmail.com ).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К.А. Тимирязева