

POTENCIAL TEHNOLOGIJE SIGS ZA ZATIRANJE GLIVE *Verticillium nonalfalfae*

Taja JESENIČNIK¹

Izvirni znanstveni članek / Original scientific article

Prispelo / Arrived: 5. 10. 2024

Sprejeto / Accepted: 21. 10. 2024

Izvleček

Gliva *Verticillium nonalfalfae* je talni patogen hmelja (*Humulus lupulus* L.), ki povzroča bolezen verticilijsko uvelost, ki lahko ob pojavu visoko virulentnih izolatov v hmeljiščih popolnoma uniči pridelek. Nadzor bolezni je trenutno omejen zgolj na ustrezne fitosanitarne ukrepe ter vzgojo odpornih kultivarjev hmelja. S škropljenjem inducirano utišanje genov (angl. spray-induced gene silencing«) ali strategija SIGS je tehnologija razvoja okolju prijaznih škropiv, ki temeljijo na uporabi dvoverižnih RNA (dsRNA) ali malih RNA (sRNA), ki posredujejo tarčno utišanje genov v škodljivih organizmih. To vodi v znižano virulenco, slabšo rast ali celo propad škodljivca. Z namenom razvoja preparata SIGS za zatiranje glive *V. nonalfalfae* smo z uporabo metode in vitro transkripcije sintetizirali dsRNA, katere tarčni komplementarni transkript je homolog gena kinaze TorA, ki je udeležena v osnovnih bioloških procesih, kot so biosinteza beljakovin, odziv na stres, celični cikel. Z in vitro inhibicijskim testom na gojišču smo dokazali, da lahko aplikacija nizkih količin čiste dsRNA zmanjša rast glive na petrijevi plošči, saj smo zabeležili od 18 do 37 % zmanjšan obseg rasti micelija glive. Omejujoči dejavnik pri aplikaciji SIGS je uspešen prevzem dsRNA iz okolja, ki se razlikuje med različnimi glivnimi vrstami, ki lahko zelo uspešno prevzemajo dsRNA molekule, medtem ko določene vrste čistih dsRNA sploh ne prevzamejo. Vnos dsRNA lahko povečamo z uporabo ustreznih nosilcev za dsRNA, kot so nanodelci, kar je naslednji korak pri razvoju preparata za zatiranje glive *V. nonalfalfae*.

Ključne besede: Interferenca RNA, SIGS, dsRNA, *Verticillium nonalfalfae*, hmelj

POTENTIAL OF SIGS TECHNOLOGY FOR SUPPRESSING THE *Verticillium nonalfalfae* FUNGUS

Abstract

The fungus *Verticillium nonalfalfae* (*V. nonalfalfae*) is a soil-borne pathogen of hops (*Humulus lupulus* L.), causing Verticillium wilt disease, that can lead to complete dyeback of plants, when highly virulent isolates appear in hop fields. Disease control is currently limited to appropriate phytosanitary measures and the cultivation of resistant hop cultivars. "Spray-induced gene silencing" (SIGS) is a technology for developing environmentally friendly pesticides with double-stranded

¹ Asist. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, e-naslov: taja.jesenicnik@bf.uni-lj.si

RNAs (dsRNA), that mediate targeted gene silencing in pests, leading to reduced virulence, slower growth, or even the death of the targeted pathogen. For the purpose of developing SIGS-based control of *V. nonalfalfae* we used in vitro transcription method to synthesize dsRNA, whose target complementary transcript is homologous to the kinase TorA gene, which is involved in essential biological processes, such as protein biosynthesis, stress response and cell cycle. In an in vitro inhibition test on growth media, we demonstrated that the application of low amounts of naked dsRNA can reduce the growth of the fungus on a petri dish where we detected 18 to 37 % reduction in mycelia growth. A limiting factor for the application of SIGS is the successful uptake of dsRNA from the environment, that varies strongly between different fungal species, from those who uptake large quantities of dsRNAs, to those who do not uptake any external dsRNAs. the dsRNA uptake can be enhanced by using appropriate carriers for dsRNA, such as nanoparticles, representing the next step in developing a formulation to control the fungus *V. nonalfalfae*.

Key words: RNA interference, SIGS, dsRNA, *Verticillium nonalfalfae*, hop

1 UVOD

Kmetijstvo se sooča s številnimi izzivi zaradi vse večje potrebe po zadostni pridelavi, ki izhaja iz naraščajočega števila svetovne populacije ter pojava škodljivih organizmov, ki povzročajo bolezni kulturnih rastlin. Ti organizmi, vključno z žuželkami, glivami, virusi, bakterijami, ogorčicami in pleveli, lahko močno zmanjšajo količino in kakovost pridelka, kar neposredno ogroža prehransko varnost. Poleg tega tradicionalne metode zatiranja škodljivih organizmov, kot so kemični pesticidi, vse pogosteje ne zadostujejo zaradi razvoja odpornosti škodljivih organizmov in škodljivih vplivov na okolje (Lankinen in sod., 2024). Nedavna odkritja, kot je prenos molekul RNA med organizmi iz različnih kraljestev v interakcijah rastlina-škodljivi organizem, so omogočila razvoj sodobnih okolju prijaznih strategij za nadzor bolezni kmetijskih rastlin. Te metode izkoriščajo naravni mehanizem interference RNA, ki deluje med rastlinami, kjer modulira odziv na okužbo, in njihovimi škodljivimi organizmi, kar znatno prispeva h patogenosti (Rabuma in sod., 2022).

Interferenca RNA (RNAi) je evolucijsko ohranjeni mehanizem regulacije genov, ki specifično zavira izražanje genov. Deluje preko majhnih molekul RNA, ki se vežejo na specifične transkripte RNA (mRNA), kar preprečuje njihovo prevajanje v beljakovine (Agrawal in sod., 2003). Osnova utišanja izražanja genov so dvoverižne molekula RNA (dsRNA), ki jih prepozna ter cepi encim Dicer, ki jih pretvori v 20-25 nukleotidov dolge RNA, imenovane majhne interferenčne RNA (siRNA). Enoverižna siRNA se vgradi v kompleks za utišanje genov, katerega sestavni del je protein Argonavt, ki s svojo endonukleazno aktivnostjo cepi tarčni komplementarni transkript mRNA, kar vodi v njegovo razgradnjo ter posledično utišanje izražanja specifičnega gena (Sang in Kim, 2020). RNAi omogoča hitro in specifično uravnavanje bioloških procesov, kot so rast in razvoj organizmov, varuje integriteto genomov, saj nudi zaščito organizmov pred virusi in ponovljivimi elementi v

genomu, prav tako pa sodeluje v odzivih na biotske in abiotske spremembe v okolju ter v interakcijah med različnimi organizmi (Villalobos-Escobedo in sod., 2016). Mehanizem RNAi ima velik potencial v biotehnologiji in medicini, saj omogoča natančno raziskovanje funkcij genov in razvoj novih terapevtskih strategij za zdravljenje bolezni. Tehnologije, ki temeljijo na mehanizmu RNAi, predstavljajo močno orodje za napredek v kmetijstvu z zagotavljanjem natančnih in ciljno usmerjenih intervencij, ki lahko vodijo do bolj trajnostnih, produktivnih in odpornih kmetijskih sistemov. Še več, v zadnjih letih so se tehnologije RNAi izkazale kot izjemno pomembne in najprimernejše metode za učinkovito obvladovanje škodljivih organizmov, pa tudi za zaščito pred abiotskimi stres, kot so suša, slanost in ekstremne temperature (Bocos-Asenjo in sod., 2022).

Tehnologija SIGS (ang. spray-induced gene silencing) izrablja naravni mehanizem RNAi v škodljivem organizmu, kjer s foliarno aplikacijo eksogenih dsRNA ali siRNA dosežemo utišanje specifičnih genov v patogenu. Tovrstni pristopi ne vodijo v razvoj odpornosti ter so okolju prijazne in trajnostne alternative komercialnim fitofarmaceutskim sredstvom (Qi in sod., 2019). Sintetizirane biološko razgradljive molekule RNA imajo specifičen in selektiven učinek na posamezne škodljive organizme. Na tržišču je od nedavnega na voljo prvi tovrstni preparat, namenjen zatiranju koloradskega hrošča in povzroči propad več kot 82 % vseh ličink (Pallis in sod., 2023). Ključni korak v razvoju pripravka z dsRNA ali siRNA je identifikacija tarčnih genov v patogenih, katerih utišanje bo imelo negativne, celo smrtonosne učinke na škodljivi organizem, vendar brez učinkov na netarčne organizme, kot je gostiteljska rastlina. Sledi proizvodnja dsRNA ali siRNA molekul, kar je mogoče izvesti z in vitro transkripcijo z uporabo različnih komercialnih kompletov ali in vivo, večinoma z uporabo bakterijskih celic *Escherichia coli* (*E. coli*) celic kot produkcijskih enot (Hough in sod., 2022). S škropljenjem pripravkov lahko neposredno zatiramo škodljive organizme, prisotne na površini listov, ki prevzamejo učinkovino z dsRNA. Po drugi strani pa lahko dsRNA prevzamejo rastlinske celice, jih pretvorijo v majhne interferenčne RNA ter po modelu prenosa signalov med kraljestvi nato utišajo tarčne gene v patogenu, ki je v interakciji z rastlino (Cai in sod., 2019). Poleg uspešnega prevzema eksogenih dsRNA, ki je odvisen od škodljivca, je eden izmed najpomembnejših dejavnikov učinkovitosti tehnologije SIGS kratka razpolovna doba molekul RNA. Potrebno je zagotoviti, da dsRNA po nanosu ne razpadejo zaradi dejavnikov, kot so toplota, pH, UV svetloba, prisotnost encimov za razgradnjo RNA (Hough in sod., 2022) ter da se pripravek z dsRNA ne spere tekom postopka oziroma s padavinami (Hoang in sod., 2022). Obstaja več različnih načinov zaščite molekul dsRNA, ki celo pospešijo prevzem eksogenih dsRNA v celice. V uporabi so metode, ki temeljijo na vezavi dsRNA na biorazgradljive nanodelce ali enkapsulacijski sistemi, ki ovijejo dsRNA (Niño-Sánchez in sod., 2022).

Gliva *Verticillium nonalfalfae* je talna gliva rodu *Verticillium sensu stricto*, ki je povzročitelj vaskularne uvelosti pri številnih pomembnih kmetijskih rastlinah (Inderbitzin in Subbarao, 2014). Gliva lahko v tleh preživi daljša obdobja v obliki melaniziranega trajnega micelija, ki kali ob prisotnosti koreninskih izločkov. Penetracijske hife okužijo korenine gostitelja, okužba pa se širi s kolonizacijo

ksilemskih žil, kar povzroči venenje prizadetih delov rastlin ali, v primeru hudih oblik bolezni, propad celotne rastline (Fradin in Thomma, 2006). Hmelj (*Humulus lupulus* L.) je eden najbolj dozgetnih gostiteljev glive *V. nonalfalae*, saj gliva povzroča izbruhe letalnih oblik bolezni v številnih hmeljarskih regijah v Evropi in drugod po svetu. Visoko virulentni patotipi povzročajo hude simptome verticilijske uvelosti hmelja, kar vodi v hitro propadanje rastlin, ki se hitro širi po celotnih hmeljiščih, povzroča obsežne izgube pridelka in vpliva na pridelavo hmelja več let (Radišek in sod., 2006). Do danes ni bil razvit noben specifičen način zdravljenja rastlin, okuženih z *V. nonalfalae*. Obvladovanje bolezni temelji na vzgoji in gojenju odpornih sort hmelja, metodah sanacije tal ter zagotavljanju ustreznih fitosanitarnih ukrepov (Mahaffee in sod., 2009).

V okviru raziskave smo preverili potencial tehnologije SIGS za zatiranje glive *V. nonalfalae*. Uporabili smo pripravek z dsRNA, katere tarča je specifičen gen glive, da bi ovrednotili njegoovo učinkovitost pri zaviranju rasti glive. Izvedli smo in vitro inhibicijski test, s katerim smo ocenili, ali in v kakšnem obsegu pripravke z dsRNA upočasnijo oziroma zmanjšajo rast *V. nonalfalae*. Rezultati poskusa nakazujejo, da bi lahko tehnologija SIGS predstavljala inovativno in trajnostno rešitev za obvladovanje glive *V. nonalfalae* v kmetijstvu.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Izbor tarčnega gena

Z obsežno študijo literature, ki je temeljila na pregledu učinkov utišanja ali delecij genov na rast in patogenost različnih gliv, smo določili tarčni genski model v anotiranem genomu glive *V. nonalfalae* VnT2_004162, ki je homolog proteina fosfatidilinozitol 3-kinaza TorA (TOR), katerega utišanje je v glivi *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) povzročilo letalne učinke na rast in preživetje glive. Protein TOR je udeležen v številnih osnovnih bioloških procesih, kot so biosinteza in razgradnja različnih beljakovin, odziv na stres, celični cikel, pa tudi v procesih v mitohondrijih, kot sta celično dihanje in presnova ornitina (Baldin in sod., 2015). Katerega utišanje oziroma delecija ima pri sorodnih glivah letalne učinke (Baldin in sod., 2015). Proteinsko zaporedje tarčnega gena smo pridobili iz [podatkovne zbirke NCBI](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). S programskim paketom CLC Genomics Workbench (verzija 24.0.2) smo proteinsko zaporedje poravnali na anotiran genom glive *V. nonalfalae* (neobjavljeno) ter na podlagi najvišje e-vrednosti ter pokritosti zaporedja identificirali genski model v genomu *V. nonalfalae* kot homolog tarčnega gena. Zaporedje genskega modela (Slika 1) smo okarakterizirali s prosto dostopnim orodjem »[CD-Search](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)«, ki omogoča identifikacijo ohranjenih proteinskih domen (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

Verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo izvedli s komercialnim kompletom FastGene® Taq DNA Polymerase (Nippon), po navodilu proizvajalca. V 50 µL reakciji PCR smo uporabili 200 ng izolirane genomske DNA ter 0,4 µM obeh začetnih oligonukleotidov. Začetni denaturaciji pri 95 °C 3 min je sledilo 35 ciklov pri 95 °C 30 sek, 60 °C 30 sek ter 72 °C 30 sek, čemur je sledilo končno pomnoževanje produktov pri 72 °C 10 min. Uspešnost pomnoževanja smo preverili z elektroforezo v 2 % agaroznem gelu po standardnih postopkih. Nato smo pomnožek PCR ustrezne dolžine izrezali iz gela ter ga očistili s komercialnim kompletom GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Cytiva), po protokolu proizvajalca.

2.3 Kloniranje produkta PCR ter transformacija bakterijskih celic

Odsek genskega modela, pomnožen v reakciji PCR, smo po navodilu proizvajalca vstavili v plazmidni vektor pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega). V standardni ligacijski reakciji smo uporabili 3 µL produkta PCR, 10 µL 2x ligacijskega pufra, 1 µL plazmidnega vektorja ter 1 µL ligaze T4. Ligacija je potekala čez noč na 4 °C.

Rekombinantne plazmidne vektorje smo vnesli v elektrokompetentne bakterijske celice *E. coli*, sev DH5α. Za transformacijo smo uporabili 50 µL na ledu odtaljene kulture celic, ki smo ji dodali 2 µL ligacijske reakcije, nato smo celice inkubirali na ledu 1 minuto. Mešanico celic *E. coli* in ligacijske reakcije smo s pipeto prenesli v ohlajeno kiveto. Sledila je transformacija z elektroporatorjem EasyjecT Prima (Equibio) pri 2.500 V za 5 ms. Mešanici smo dodali 950 µL tekočega Luria Bertani (LB) gojišča (L 1704, Duchefa) ter jih stresali eno uro na 37 °C in 120 rpm. Po 50, 100 in 150 µL bakterijskih kultur smo razmazali po trdnem gojišču LB (L 1706, Duchefa) ter plošče preko noči inkubirali na 37 °C. Naslednji dan smo bakterijske kolonije precepili v tekočega gojišče LB ter kulture preko noči gojili na 37 °C in 120 rpm.

2.4 Izolacija in linearizacija plazmidne DNA

Iz namnoženih transformiranih bakterijskih celic smo izolirali plazmidno DNA z uporabo komercialnega kompleta High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche), po navodilu proizvajalca. Nato smo plazmidno DNA uporabili v dveh ločenih restrikcijskih reakcijah, ki sta vsebovali po en restrikcijski encim, da smo linearizirali plazmidno DNA. Uporabili smo restrikcijska encima Spel (NEB) ter NcoI-HF (NEB), pri čemer encim Spel reže dvo verižno DNA za mestom kloniranja, encim NcoI-HF pa pred mestom kloniranja. V 50 µL restrikcijskih reakcijah smo uporabili po 1000 ng plazmidne DNA ter 5 µL 10x restrikcijskega pufra cutSmart (NEB) in 1 µL restrikcijskega encima. Reakcije smo inkubirali na 37 °C 15 min, nato je sledila inaktivacija encimov na 80 °C 20 min. Uspeh linearizacije smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo na 1,4 % agaroznem gelu. Linearizirano plazmidno DNA smo očistili s komercialnim kompletom MEGAscript® Kit (ThermoFisher), po navodilu proizvajalca.

2.5 In vitro transkripcija in sinteza dsRNA

Plazmidno DNA, linearizirano z encimom SpeI, smo uporabili v reakciji in vitro transkripcije s komercialnim kompletom MEGAscript™ T7 Transcription Kit (Invitrogen), po protokolu proizvajalca. V reakciji smo uporabili 1000 ng linearizirane plazmidne DNA. Z encimom NcoI-HF linearizirano plazmidno DNA smo uporabili v drugi in vitro transkripcijski reakciji, kjer smo uporabili komercialni komplet MEGAscript™ SP6 Transcription Kit (Invitrogen), po priloženem navodilu. V reakcijo smo dodali 1000 ng linearizirane plazmidne DNA. Reakcije smo čez noč inkubirali na 37 °C. Naslednji dan smo vzorce tretirali z encimom TURBO DNase, ki je prav tako del komercialnega kompleta, da smo odstranili matrično plazmidno DNA. V obe in vitro transkripcijski reakciji smo dodali po 1 µL encima ter reakcije inkubirali na 37 °C 15 min. Nato smo pridobljene eno verižne RNA molekule očistili s komercialnim kompletom MEGAclean™ Transcription Clean-Up Kit (Invitrogen), po protokolu proizvajalca. Koncentracije sintetiziranih eno verižnih RNA smo določili s spektrofotometrom NanoVue (dDBioLab).

Očiščene eno verižne RNA, prepisane s polimerazo T7 ter SP6 smo razredčili na delovno koncentracijo 1000 ng/ µL (50 µL) ter združili enaka volumna obeh redčitev v novi mikrocetrifugirki. Nato smo vzorec v termobloku segreli na 95 °C ter ga postopno ohlajali do 4 °C (zniževanje temperature po eno stopinjo na minuto), pri čemer so se verige eno verižnih RNA povezale ter tvorile dsRNA. Tako pripravljene dsRNA, katerih tarča je izbrani genski model, smo uporabili kot pripravek za tretiranje glive po modelu SIGS.

2.6 In vitro test inhibicije rasti glive

Učinek dsRNA na rast glive smo preverili z in vitro inhibicijskim testom, kjer smo visoko virulentni izolat glive *V. nonalfalae* T2 gojili na petrijevi plošči na trdnem gojišču Czapek Dox (45 g/L, Duchefa). Na več plošč smo po kapljicah dodajali različne količine dsRNA (500 ng, 1000 ng, 1500 ng in 2000 ng) ter na kapljico dodali 0,5 cm inokulum micelija visoko virulentnega izolata T2, ki smo ga izrezali s plutovrtom. Na ploščo smo inokulum micelija položili obrnjenega, da se je micelij dotikal raztopine dsRNA, v dveh bioloških ter treh tehničnih ponovitvah. V kontrolni skupini smo glivo gojili na gojišču brez dsRNA, kjer smo uporabili vodo. Kulture smo inkubirali na 25 °C v temi 10 dni. Deset dni po inokulaciji smo plošče s kulturami gliv fotografirali ter s prosto dostopnim programskim paketom [ImageJ](https://imagej.net/ij/) (<https://imagej.net/ij/>) izmerili premer in površino glivnih kultur ter določili obseg inhibicije rasti tretiranih kultur v primerjavi z netretiranimi.

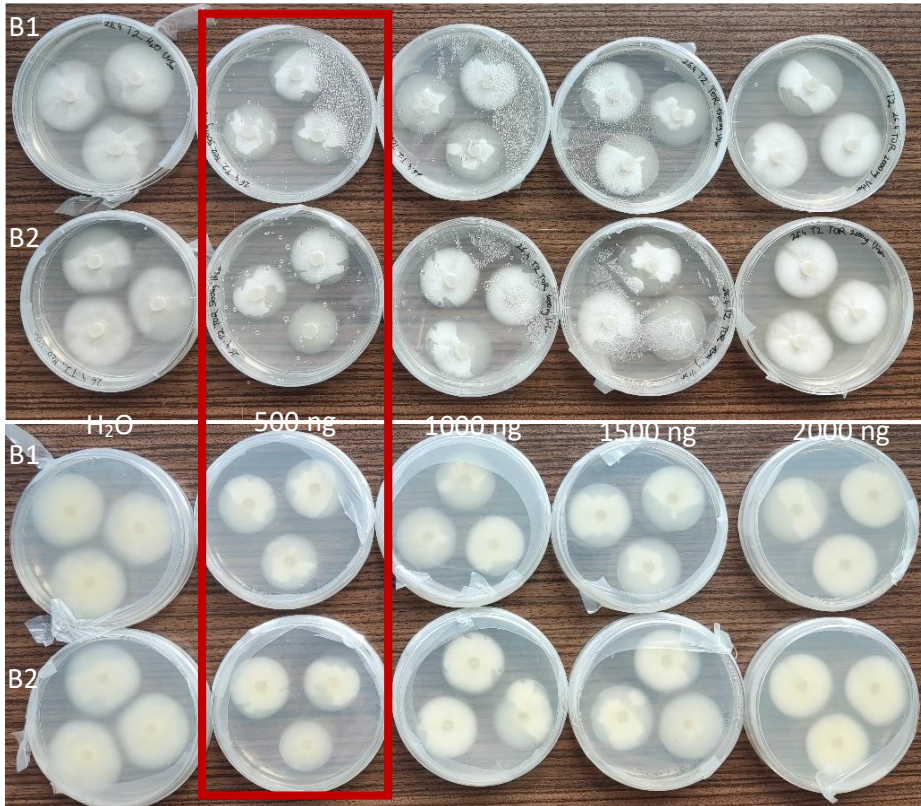
3 REZULTATI Z RAZPRAVO

V naši raziskavi smo na laboratorijskem nivoju preverili možnost tehnologije SIGS za zatiranje glive *V. nonalfalae*. Patogene glive namreč predstavljajo resno grožnjo pridelavi pomembnih poljščin, kot so riž, pšenica, koruza, soja ter korenovke in gomoljnice. Sodobno intenzivno kmetijstvo, ki temelji na genetsko uniformiranih rastlinah in uporabi kemičnih fungicidov, še dodatno spodbuja pojav novih, virulentnih in na fungicide odpornih sevov. Najpogosteje uporabljeni fungicidi, kot

so metil benzimidazol karbamati, strobilurini in azoli, imajo številne okoljske posledice, vključno z onesnaženjem tal in podtalnice ter škodljivimi učinki na netarčne organizme, kot so čebele (Rosa in sod., 2022). Ravno aplikacije tehnologije SIGS pa predstavljajo najobetavnejše orodje za učinkovit in okolju prijazen nadzor bolezni rastlin, ki sledi smernicam Evropske unije ter ne vključuje genskega spreminjanja rastlin. V SIGS preparatih uporabljene dsRNA imajo visoko specifičnost in so hitro razgradljive ter učinkovite že v nizkih količinah (Pallis in sod., 2023), kar jih skupaj z novimi strategijami dostave naredi primerne za sisteme preciznega kmetijstva (Das in sod., 2023).

V študiji smo preverili učinkovitost dsRNA, katere tarča je genski model VnT2_004162, ki je homolog kinaze TorA (TOR). Utišanje oziroma delecija gena TorA je povzročilo letalne učinke v glivi *A. fumigatus*. Po lastnem protokolu za sintezo dsRNA, ki vključuje kloniranje DNA ter *in vitro* transkripcijo, smo pridobili 243 bp dolgo molekulo dsRNA, ki je komplementarna genskemu modelu VnT2_004162 v regiji, ki ne obsega znanih ohranjenih proteinskih domen kinaze TorA in je zato specifična za glivo *V. nonalfalae*.

V poskusu smo želeli določiti optimalno količino dsRNA TOR, ki zavre rast glive *V. nonalfalae* v *in vitro* pogojih na plošči. Po 10 dneh gojenja tretiranih ter netretiranih kultur, ko smo še lahko jasno razločili posamezne kulture micelija glive treh tehničnih ponovitev na eni plošči, smo preverili rast glive ter določili, da je bil največji inhibicijski učinek na rast dosežen po tretiranju glive s 500 ng dsRNA (Slika 2), pri čemer so rezultati skladni med biološkima ter tehničnimi ponovitvami.



Slika 2: Rezultati in vitro inhibicijskega testa učinka različnih količin dsRNA na rast glive v primerjavi z netretiranimi kulturami (oznaka H₂O). Izpostavljena je izbrana optimalna količina dsRNA, ki je v največjem obsegu zmanjšala rast glive na gojišču; B1 – 1. biološka ponovitev T2, B2 – 2. biološka ponovitev T2, vsaka biološka ponovitev je inokulirana v treh tehničnih ponovitvah na posamezno ploščo.

S programskim paketom ImageJ smo izmerili premer ter površino vseh tehničnih in bioloških ponovitev kultur izolata T2 ter izračunali obseg inhibicije rasti kot razliko med površino kulture, ki je bila tretirana z določeno količino dsRNA ter netretirano kulturo, ki je bila inokulirana na kapljico vode. V tabeli 1 so povzete povprečne meritve ter odstotek inhibicije rasti izolata T2 *V. nonalfalfae* po tretiranju z dsRNA.

Preglednica 1: Premeri in površine kultur ter odstotek inhibicije rasti izolata T2 na gojišču Czapek Dox po tretiranju z različnimi količinami dsRNA TOR

Vzorec	Količina dsRNA [ng]	Povprečen premer bioloških ponovitev [mm]	Povprečna površina bioloških ponovitev [mm ²]	Standardni odklon med ponovitvami [mm ²]	Odstotek inhibicije rasti [%]
T2	2000	36,9	1055,8	39,6	18,6

Vzorec	Količina dsRNA [ng]	Povprečen premer bioloških ponovitev [mm]	Povprečna površina bioloških ponovitev [mm ²]	Standardni odklon med ponovitvami [mm ²]	Odstotek inhibicije rasti [%]
T2	1500	36,7	1010,8	46,5	22,1
T2	1000	34,6	934,5	102,2	27,9
T2	500	32,1	808,6	100,5	37,7
T2	H2O	40,9	1297,0	58,5	/

Utišanje oziroma delecija kinaze TorA ima smrtonosne učinke na glivo *A. fumigates* (Baldin in sod., 2015). Ker smo v genomu glive *V. nonalfalfae* našli homologni genski model, smo podoben efekt pričakovali po tretiranju glive s sintetizirano dsRNA, ki pa ga z in vitro inhibicijskim testom nismo uspeli doseči. Največji delež inhibicije rasti je bil opažen pri kulturah gliv, ki so bile inokulirane na 500 ng dsRNA TOR, kjer je bila rast slabša za skoraj 38 % v primerjavi z netretiranimi kulturami. Povečevanje količine dsRNA ni imelo bistvenega učinka na rast glive, saj lahko opazimo, da je inhibicija rasti manjša oziroma celo najmanjša pri največji uporabljeni količini dsRNA (2000 ng). Menimo, da je omejujoči dejavnik pri uporabi dsRNA za zatiranje glive *V. nonalfalfae* prevzem čistih dsRNA iz okolja, saj je prav ta proces ključnega pomena in lahko močno omeji uporabo tehnologije SIGS za zatiranje specifičnih patogenov. Študija prevzema čistih dsRNA v celice različnih gliv je namreč dokazala, da se učinkovitost prevzema dsRNA med glivnimi vrstami močno razlikuje. Nekatere glive, kot je *Colletotrichum gloeosporioides*, ne morejo prevzeti dsRNA iz okolja, medtem ko imajo glive *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aspergillus niger* ter *Rhizobium solani* visoko učinkovitost prevzema RNA (Qiao in sod., 2021).

Poleg uspešnosti prevzema dsRNA pa je za razvoj preparata SIGS ključno, da imajo patogeni delujoč RNAi mehanizem. Gliva *V. nonalfalfae* vsebuje vse potrebne komponente delujočega mehanizma RNAi, to so Od RNA odvisna polimeraza RNA (RdRP), encimu Dicer podobna endonukleaza (DCL) ter protein Argonavt (AGO) (Jeseničnik in sod., 2019). DsRNA lahko v čisti obliki zaradi zunanjih dejavnikov hitro razpadejo oziroma so aktivne kratek čas (Qiao in sod., 2021), zato je, skupaj s specifično dsRNA, potrebno razviti tudi sistem za zaščito in stabilizacijo dsRNA oziroma ustrezno formulacijo, ki bo omogočala učinkovito in ciljno dostavo dsRNA. Ker gre za talno glivo, ki rastlino okuži preko korenin in se nato preko ksilema razširi po rastlini, je posebej pomembno, da formulacija omogoča ciljno dostavo v koreninski sistem oziroma zaščito dsRNA v tleh. Ena izmed možnosti je uporaba nanodelcev kot nosilcev čistih dsRNA, ki lahko povečajo celični prevzem dsRNA, izboljšajo UV-stabilnost ter adsorpcijo na površine in zagotovijo dolgoročno zaščito dsRNA (Rank in Koch, 2021). Po drugi strani pa lahko dostavo aktivne učinkovine zagotovimo tudi preko škropljenja nadzemnih delov gostiteljske rastline. Ko rastlinske celice pretvorijo dsRNA v sRNA, jih lahko izločijo v prevodni sistem, kjer pridejo v stik glivo. Rastlina preko svojega naravnega mehanizma RNAi ter

eksporta majhnih RNA omogoči, da sRNA dosežejo glivo, ki je prisotna v prevodnem sistemu. Ko sRNA vstopi v glivne celice, utiša specifične gene, ki so ključni za preživetje ali patogenost glive, s čimer prepreči nadaljnjo okužbo in propad rastline (Wang in Jin, 2017).

4 ZAKLJUČEK

Naša raziskava je preučila potencial tehnologije SIGS za zatiranje glive *V. nonalfalae*, ki predstavlja grožnjo pomembnim kmetijskim pridelkom. Čeprav je utišanje gena TOR pri glivi *A. fumigatus*, povzročilo letalni efekt, podobnih rezultatov pri glivi *V. nonalfalae* nismo dosegli. Največji zaviralni učinek (38 %) smo opazili pri uporabi 500 ng dsRNA, vendar nadaljnje povečevanje količine dsRNA ni izboljšalo inhibicije rasti. Menimo, da je omejujoči dejavnik nizka učinkovitost prevzema dsRNA iz okolja, kar je ključno za uspešno uporabo tehnologije SIGS. Razvoj stabilnejših formulacij, na primer z uporabo nanodelcev, bi lahko povečal učinkovitost celičnega prevzema, izboljšal stabilnost in omogočil bolj ciljno usmerjeno zaščito pred patogeni. Na podlagi naših ugotovitev menimo, da ima tehnologija SIGS oziroma uporaba okolju prijaznih dsRNA zelo velik potencial za zatiranje glive *V. nonalfalae*, vendar je za uspešno uporabo SIGS potrebna optimizacija dostave in stabilnosti dsRNA, kar bomo v prihodnosti poskušali doseči z uporabo različnih vrst nanodelcev. Prav tako pa bomo s testi patogenosti na modelnih ter gostiteljski rastlini preverili tudi, ali je za uspešno obvladovanje glive *V. nonalfalae* dovolj zgolj znižana virulenca z uporabo dsRNA, ne nujno letalni efekt.

Zahvala. Avtorica se za finančno pomoč zahvaljujem Javni agenciji za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (raziskovalni program P4-0077). Za podporo pri zasnovi poskusa se zahvaljujem prof. dr. Jerneju Jakšetu. Zahvala gre tudi dijakinjama Biotehniškega izobraževalnega centra Ljubljana Baji Požar ter Lili Barborič ter študentki Urši Grohar za pomoč pri izvedbi poskusa.

5 VIRI

- Agrawal N., Dasaradhi P. V., Mohammed A., Malhotra P., Bhatnagar R. K., Mukherjee S. K. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003; 67, 4:657-685.
- Bagar T., Altenbach K., Read N. D., Bencina M. Live-cell imaging and measurement of intracellular pH in filamentous fungi using a genetically encoded ratiometric probe. *Eukaryot Cell* 2009; 8: 703-712.
- Baldin C., Valiante V., Krüger T., Schaffner L., Haas H., Knemeyer O., Brakhage A.A. Comparative proteomics of a tor inducible *Aspergillus fumigatus* mutant reveals involvement of the Tor kinase in iron regulation. *Proteomics* 2015; 15: 2230-2243.
- Bocos-Asenjo I. T., Niño-Sánchez J., Ginésy M., Diez J. J. New Insights on the Integrated Management of Plant Diseases by RNA Strategies: Mycoviruses and RNA Interference. *Int J Mol Sci.* 2022; 23, 16: 9236.
- Cai Q., He B., Weiberg A., Buck A. H., Jin H. Small RNAs and extracellular vesicles: New mechanisms of cross-species communication and innovative tools for disease control. *PLoS Pathog.* 2019, 15, 12: e1008090.

- Das S., Ray M. K., Panday D., Mishra P. K. Role of biotechnology in creating sustainable agriculture. *PLOS Sustainability and Transformation* 2023; 2, 7: e0000069.
- Fradin E. F., Thomma B. P. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Mol Plant Pathol* 2006; 7, 2: 71-86.
- Hoang B. T. L., Fletcher S. J., Brosnan C. A., Ghodke A. B., Manzie N., Mitter N. RNAi as a Foliar Spray: Efficiency and Challenges to Field Applications. *Int J Mol Sci* 2022; 23, 12: 6639.
- Hough J., Howard J. D., Brown S., Portwood D. E., Kilby P. M., Dickman M. J. Strategies for the production of dsRNA biocontrols as alternatives to chemical pesticides. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022; 10: 980592.
- Inderbitzin P., Subbarao K. V. *Verticillium* systematics and evolution: how confusion impedes *Verticillium* wilt management and how to resolve it. *Phytopathology* 2014; 104, 6: 564-74.
- Jeseničnik T., Štajner N., Radišek S., Jakše J. RNA interference core components identified and characterised in *Verticillium nonalfalfae*, a vascular wilt pathogenic plant fungi of hops. *Sci Rep* 2019; 9, 1: 8651.
- Lankinen Å., Witzell J., Aleklett K., Furenhed S., Karlsson Green K., Latz M., Liljeroth E., Larsson R., Löfkvist K., Meijer J., Menkis A., Ninkovic V., Olson A., Grenville-Briggs L. Challenges and opportunities for increasing the use of low-risk plant protection products in sustainable production. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 2024; 44, 21: 22 str.
- Lee P. Y., Costumbrado J., Hsu C. Y., Kim Y. H. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp.* 2012, 62:3923.
- Mahaffee W. F., Pethybridge S. J., Gent D. H. *Compendium of Hop Diseases and Pests*. American Phytopathological Society, APS Press, 2009: 93 str.
- Niño-Sánchez J., Sambasivam P. T., Sawyer A., Hamby R., Chen A., Czislowski E., Li P., Manzie N., Gardiner D. M., Ford R., Xu Z. P., Mitter N., Jin H. BioClay™ prolongs RNA interference-mediated crop protection against *Botrytis cinerea*. *J Integr Plant Biol.* 2022; 64, 11: 2187-2198.
- Pallis S., Alyokhin A., Manley B., Rodrigues T., Barnes E., Narva K. Effects of Low Doses of a Novel dsRNA-based Biopesticide (*Calantha*) on the Colorado Potato Beetle. *J Econ Entomol.* 2023, 116, 2:456-461.
- Qi T., Guo J., Peng H., Liu P., Kang Z., Guo J. Host-Induced Gene Silencing: A Powerful Strategy to Control Diseases of Wheat and Barley. *Int J Mol Sci* 2019; 20, 1: 206.
- Qiao L., Lan C., Capriotti L., Ah-Fong A., Nino Sanchez J., Hamby R., Heller J., Zhao H., Glass N. L., Judelson H. S., Mezzetti B., Niu D., Jin H. Spray-induced gene silencing for disease control is dependent on the efficiency of pathogen RNA uptake. *Plant Biotechnol J* 2021; 19, 9: 1756-1768.
- Rabuma T., Gupta O. P., Chhokar V. Recent advances and potential applications of cross-kingdom movement of miRNAs in modulating plant's disease response. *RNA Biol.* 2022;19, 1:519-532.
- Radišek S., Jakše J., Javornik, B. Genetic variability and virulence among *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. *Eur J Plant Pathol* 2006; 116: 301–314.
- Rank A. P., Koch A. Lab-to-Field Transition of RNA Spray Applications - How Far Are We? *Front Plant Sci* 2021; 12: 755203.
- Rosa S., Pesaresi P., Mizzotti C., Bulone V., Mezzetti B., Baraldi E., Masiero S. Game-changing alternatives to conventional fungicides: small RNAs and short peptides. *Trends Biotechnol* 2022; 40, 3: 320-337.
- Sang H., Kim J. I. Advanced strategies to control plant pathogenic fungi by host-induced gene silencing (HIGS) and spray-induced gene silencing (SIGS). *Plant Biotechnol Rep* 2020; 14: 1–8.
- Villalobos-Escobedo J. M., Herrera-Estrella A., Carreras-Villaseñor N. The interaction of fungi with the environment orchestrated by RNAi. *Mycologia* 2016; 108, 3:556-571.
- Wang M., Jin H. Spray-Induced Gene Silencing: a Powerful Innovative Strategy for Crop Protection. *Trends Microbiol.* 2017, 1:4-6.