

## МАЛЫЕ РНК В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ ОТ БОЛЕЗНЕЙ

© П.Я. Третьякова<sup>1</sup>, А.А. Соловьев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К.А. Тимирязева», Москва;

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва

Для цитирования: Третьякова П.Я., Соловьев А.А. Малые РНК в защите растений от болезней // Экологическая генетика. — 2020. — Т. 18. — № 4. — С. 467–481. <https://doi.org/10.17816/ecogen35203>.

Поступила: 16.07.2020

Одобрена: 04.11.2020

Принята: 23.09.2020

☼ Двухцепочечные малые РНК (дцРНК), включаясь в процесс РНК-интерференции, выполняют различные регуляторные функции во многих организмах. Были описаны случаи обмена малыми РНК между разными видами растений и поражающими их патогенами и вредителями посредством внеклеточных везикул (крошечных пузырьков), которые защищают их от действия нуклеаз. Растения секретируют двухцепочечные короткие молекулы РНК для борьбы с возбудителями заболеваний, а те, в свою очередь, используют малые РНК как инструмент, позволяющий им ослабить иммунитет хозяев. Некоторые дцРНК патогенов получили название «рибонуклеиновых эффекторов». Технология HIGS (host induced gene silencing — сайленсинг, индуцируемый растением-хозяином) показала свою эффективность в создании устойчивых сортов сельскохозяйственных культур и изучении различных патосистем. Однако использование ее ограничено из-за сложности создания трансгенных линий и запрета на их выращивание во многих странах. Распыление дцРНК по поверхности листьев, стеблей и соцветий растений может стать новым приемом контроля заболеваний, способным заменить использование пестицидов. На данный момент такая стратегия требует тщательного анализа и доработки, а также создания дешевых систем, стабильно синтезирующих дцРНК хорошего качества.

☼ **Ключевые слова:** малые РНК; сайленсинг; HIGS; SIGS; РНК-интерференция; хозяин; патоген; везикулы; эффектор; дцРНК.

## APPLICATION OF SMALL RNAs FOR PLANT PROTECTION

© P.Ya. Tretiakova<sup>1</sup>, A.A. Soloviev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

Cite this article as: Tretiakova P.Ya., Soloviev A.A. Application of small RNAs for plant protection. *Ecological genetics*. 2020;18(4):467-481. <https://doi.org/10.17816/ecogen35203>.

Received: 16.07.2020

Revised: 04.11.2020

Accepted: 23.09.2020

☼ Double-stranded small RNAs (dsRNA) perform various regulatory functions via RNA-interference. Additionally, they can be transported between various plant species and their pathogens and pests via extracellular vesicles, protecting RNA from nucleases. Plants secrete short dsRNA molecules to defend themselves against pathogens. The latter also use small RNAs when infecting crops. Some dsRNAs of pathogens are known as “ribonucleic effectors”. Host-induced gene silencing (HIGS) was shown to be effective when breeding resistant varieties and analyzing plant-pathogen interactions. However, complexity of transgenesis and society fear of genetically modified products make HIGS application difficult. The appearance of a new strategy based on plant spraying with dsRNA gave a new perspective of plant protection. Currently such a strategy requires accurate studying as well as the development of efficient systems stably producing high-quality dsRNA.

☼ **Keywords:** small RNA; silencing; HIGS; SIGS; RNA-interference; host; pathogen; vesicle; effector; dsRNA.

## ВВЕДЕНИЕ

Растения смогли развить многоуровневые механизмы защиты от патогенов и вредителей в процессе эволюции. В свою очередь, патогены развили стратегии, позволяющие им подавлять или предупреждать иммунный ответ их хозяев.

Один и тот же микроорганизм будет по-разному взаимодействовать с несколькими хозяевами, запуская каскад специфических реакций. Некоторые аспекты таких взаимодействий могут быть использованы для разработки приемов, снижающих вирулентность патогенов. Поиск новых методов

контроля за возбудителями заболеваний имеет и будет иметь огромное значение для обеспечения продовольственной безопасности, поскольку возбудители заболеваний сельскохозяйственных культур продолжают эволюционировать, в результате чего возрастает их устойчивость к пестицидам и защитным механизмам растений-хозяев.

За последнее десятилетие было показано, что малые молекулы рибонуклеиновой кислоты (РНК) принимают большое участие во многих биологических процессах эукариот, регуляции роста, развития, размножении и защитных реакциях организмов. Малые РНК могут перемещаться как внутри одного, так и между взаимодействующими организмами (например, от растения-хозяина к патогену и наоборот), а результат их деятельности — сайленсинг определенных генов.

### ТИПЫ МАЛЫХ РНК И ИХ УЧАСТИЕ В РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

Малые РНК включают в себя два больших класса — микро- и малых интерферирующих РНК (miРНК и siРНК). miРНК и siРНК представляют собой некодирующие молекулы, размером 20–30 п. н., которые встречаются у различных организмов и принимают участие во многих регуляторных процессах. Отличие miРНК от siРНК состоит в том, что последние образуются при разрезании длинной молекулы дцРНК, в то время как miРНК имеет структуру шпильки, сформированной из одноцепочечной РНК под воздействием рибонуклеаз класса РНКазы III. Являясь важным компонентом РНК-интерференции и включаясь в состав комплекса RISC (RNA-induced silencing complex — РНК-индуцируемый сайленсинговый комплекс), miРНК и siРНК способны активировать процесс расщепления гомологичной мРНК [1].

Также в РНК-интерференции участвуют рибонуклеаза Dicer (семейство РНКазы III), которая разрезает большие молекулы дцРНК, и белок Argonaute, который входит в состав RISC и обладает эндонуклеазной активностью по отношению к мРНК. Каким же образом Argonaute распознает именно «ту самую» РНК? Дело в том, что после включения малой РНК в RISC происходит раскручивание двухцепочечной молекулы, при этом смысловая цепь деградирует, а антисмысловая используется в качестве «навигатора», бла-

годаря которому белок Argonaute, имея короткий участок связывания с РНК, расщепит ту молекулу, которая будет комплементарна антисмысловой цепи [2–4]. Еще один важный момент заключается в том, что РНК-интерференция приводит к снижению, а не к полной остановке экспрессии гена, уровень которой зависит от концентрации малых РНК [5].

Несмотря на то что образование многих малых РНК связано с действием белков Dicer, были открыты несколько альтернативных путей формирования малых РНК, включая Dicer-независимый механизм. Такие РНК получили название Dicer-независимые малые интерферирующие РНК (Dicer-independent small interfering RNA — disiРНК) [6]. Множество локусов, формирующих disiРНК, приводят к образованию перекрывающихся фрагментов смысловых и антисмысловых транскриптов [7, 8].

У нескольких видов микроскопических грибов, например *Saccharomyces cerevisiae* Hansen и *Ustilago maydis* Corda, отсутствуют некоторые ключевые элементы РНК-интерференции [9, 10]. Например, у *Erysiphe necator* Schwein отсутствует РНК-зависимая РНК-полимераза и ДНК-метилаза, что, скорее всего, означает, что этот вид не способен осуществлять РНК-интерференцию [11]. Также было обнаружено, что среди грибов имеется большое разнообразие в количестве паралогов (гомологов) белков семейства Argonaute и РНК-зависимой РНК-полимеразы [11, 12]. Отсутствие/присутствие компонентов РНК-интерференции было описано в таких растительных патогенах, как *U. maydis* (не способен к РНК-интерференции) и *Ustilago hordei* Lagerh. (способен к РНК-интерференции) [10].

У некоторых видов микроскопических грибов был обнаружен класс малых РНК, получивших название miРНК (microRNA-like RNA — микроРНК-подобная РНК) [7]. Особенность miРНК заключается в том, что они синтезируются только у одного вида в пределах рода. Например, MILR1 представлена только у *Puccinia striiformis* Westend, а у других возбудителей ржавчины *Puccinia graminis* Persoon и *Puccinia triticina* Erikss. она отсутствует. Тем не менее MILR1 консервативна у различных штаммов *P. striiformis*. Скорее всего, образование MILR1 только у одного вида может

быть результатом его эволюции и адаптации к определенному растению-хозяину.

В растениях малые РНК могут обладать несколькими функциями. Они могут традиционно включаться в комплексы, приводя к деградации мРНК, а могут инициировать синтез дополнительных siРНК [13]. В соответствии с этим, молекула малой РНК может называться первичной (образуется при разрезании большой молекулы дцРНК белком Dicer) или вторичной (синтезируется под действием РНК-зависимой РНК-полимеразы). Оба вида РНК в дальнейшем принимают участие в РНК-интерференции [14].

Малые РНК очень мобильны и способны перемещаться по всему организму [15–17]. У растений они, как правило, передвигаются по флоэме из областей с высокой концентрацией в места с дефицитом этих молекул [18]. В ксилеме, по которой идет движение воды и ионов, РНК обычно отсутствует [19].

Описаны случаи перемещения 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. Причем обмен малыми РНК осуществляется в обоих направлениях [20, 21]. Патогены и вредители направляют малые РНК в клетки хозяина для подавления его иммунитета, а растения, в свою очередь, выделяют малые РНК, которые прямо или косвенно ингибируют вирулентность возбудителей заболеваний [22–28]. С открытием данного явления появился такой термин, как транс-действующая малая интерферирующая РНК (trans-acting small interfering RNAs — tasiРНК). TasiРНК не всегда имеет идеальное соответствие последовательностям целевых генов и, по-видимому, один вид tasiРНК может подавлять экспрессию нескольких генов [29].

Поскольку перенос малых РНК происходит как от хозяев к патогенам, так и от патогенов к хозяевам, можно предположить, что такое явление имеет эволюционное значение в развитии «отношений» между несколькими видами, позволяя одним организмам расширить круг поражаемых биологических единиц и, в то же время, давая другим организмам возможность противостоять большему количеству патогенов и вредителей.

Многие молекулы tasiРНК схожи между собой в размере (20–25 п. н.) и строении. Известно, что на 5'-конце таких молекул присутствует уридин, который является важным элементом функционирования малых РНК патогенов в организмах растений [30–35]. Уридин, по-видимому, принимает участие в связывании малых РНК с определенным белком семейства Argonaut — AGO1 [36].

P. Baldrich и соавт. [37] описали еще один вид малых РНК, размером 10–17 п. н., которые получили название сверхмалых РНК (tiny RNA — tyРНК). Возможно, tyРНК — продукт деградации различных молекул РНК — первичной miРНК, siРНК, tasiРНК и др. Однако tyРНК может также выполнять функцию малых активирующих РНК (small activating RNA — saРНК), которые индуцируют процесс транскрипции [38].

#### ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ ОБМЕНА МАЛЫМИ РНК МЕЖДУ ОРГАНИЗМАМИ

Одним из первых вопросов, возникающих при изучении обмена РНК между видами, является то, каким именно образом происходит такой вид «коммуникации». Первое возможное объяснение связывали с физическими законами, а именно с диффузией, зависимой от концентрации. Однако в дальнейшем стали склоняться к мнению, что должен существовать более сложный селективный процесс.

Между клетками животных перенос miРНК осуществляется с помощью экзосом, класса внеклеточных везикул [39, 40]. Внеклеточные везикулы животного происхождения делятся на экзосомы, микровезикулы (эктосомы) и апоптотические тельца по специфическим белковым маркерам и месту образования [41]. У животных малые РНК могут также транспортироваться с помощью трансмембранных белков, липопротеиновых комплексов высокой плотности или щелевых контактов [42]. Известно, например, что желудочно-кишечный паразит *Heligmosomoides polygyrus* синтезирует экзосомы для переноса miРНК в клетки млекопитающих для снижения их иммунитета [25].

В растениях малые РНК, по-видимому, перемещаются от клетки к клетке через плазмодесмы (внутриклеточные мостики) и циркулируют по сосудистой системе [15, 43]. Однако недавно было обнаружено, что, как и у животных, в растениях

происходит синтез везикул, которые принимают участие в доставке РНК в клетки других организмов. При этом, например, грибные клетки способны эффективно поглощать экзосомы растений. Скорее всего, эти экзосомы защищают малые РНК от атаки нуклеаз в жидкостях организма, что объясняет их стабильность и активность после переноса [8, 21].

Так, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh секретирует экзосомы, содержащие малые РНК, с целью подавления экспрессии генов вирулентности некоторых грибов. Растения хлопчатника экспортируют в гифы гриба *Verticillium dahliae* Kleb. miРНК (MIR166 и MIR159), которые отрицательно воздействуют на экспрессию генов, кодирующих синтез  $Ca^{2+}$ -зависимой цистеиновой протеазы (*Clp-1*) и изотриходермин-С-15-гидроксилазы (*HiC-15*). Оба гена играют значительную роль в вирулентности гриба [28]. У некоторых грибов, например у *Fusarium graminearum* (Schwein.) Petch, именно гифы принимают большое участие в перемещении РНК [17]. Нужно отметить, что малые РНК трансгенных организмов также доставляются в клетки грибов с помощью внеклеточных везикул [26].

Q. Cai и соавт. [43] обнаружили, что в клетках *A. thaliana* происходит синтез внеклеточных пузырьков (везикул), с помощью которых малые РНК транспортируются в организм *Botrytis cinerea* Persoon. Присутствие трансмембранных белков (тетраспанинов — TET8-CFP и TET9-YFP) в высокой концентрации и положительное влияние на иммунитет растения связанных с ними экзосом, скорее всего, являются результатом переноса малых РНК хозяина в клетки гриба для направленного снижения экспрессии генов вирулентности.

Н. Feng и соавт. [44] провели анализ miРНК, синтезируемых в пшенице при ее заражении грибом *P. striiformis* и выделили гены, являющиеся мишенью для некоторых микроРНК. Эти гены кодируют биосинтез белка, имеющего домен RabGAP/TBC, белка «цинковые пальцы» и цистеин-богатой рецептор-подобной протеинкиназы-4I в пшенице и, возможно, играют большую роль во взаимодействии генов устойчивости пшеницы с генами авирулентности в *P. striiformis*.

Межродовой обмен РНК был замечен и у человека при доставке miРНК в клетки паразита *Plasmodium falciparum* Welch, которые направ-

лены на подавление действия генов вирулентности последнего. Это объясняет, почему пациенты с серповидно-клеточной анемией, имея повышенный уровень транспортируемых miРНК, становятся более устойчивыми к малярии [45].

## МАЛЫЕ РНК КАК ИНСТРУМЕНТ АТАКИ ПАТОГЕНОВ

Патогенные микроорганизмы и вредители в процессе эволюции развили механизмы, позволяющие им снизить сопротивляемость хозяина. Один из таких механизмов — синтез эффекторов, специфических белковых молекул, которые направленно действуют на определенные молекулярные структуры организма хозяина [46–48]. Недавно было открыто, что кроме белков схожими функциями могут обладать молекулы малых РНК, которые при попадании в организм хозяина подавляют экспрессию некоторых генов [36]. Вероятно, РНК-эффекторы в большинстве своем действуют против тех генов, которые являются ключевыми элементами врожденной иммунной системы хозяина. Они либо снижают экспрессию гомологичных генов, устраняя так называемую функциональную избыточность, либо прямо или косвенно подавляют скорость и эффективность иммунного ответа [23].

При заражении *A. thaliana* грибом *B. cinerea* происходит снижение синтеза митоген-активируемой белковой киназы-1 (mitogen-activated protein kinase 1 — МРК1) и МРК2, пероксиредоксина (peroxiredoxin-2F — PRXIIIF) и киназы, связанной с клеточной стенкой (cell wall-associated kinase — WAK). У томата был подавлен биосинтез MAPKKK4 (mitogen-activated protein kinase kinase 4) — еще одной киназы MAP-киназного каскада, напрямую влияющей на устойчивость растений к *B. cinerea* [24].

Получается, что патоген использует систему сайленсинга самого растения для получения преимущества во время колонизации. При выделении и осаждении белка Argonaute (AGO1 — Argonaute RISC Component 1), который, как известно, необходим как компонент пост-транскрипционного сайленсинга генов, в белковой фракции, выделенной из листьев зараженного *A. thaliana*, были обнаружены малые РНК патогена, связанные с AGO1 растения [24].

При исследовании возбудителей мучнистой росы *S. Kusch* и соавт. [11] проанализировали несколько представителей малых РНК, выделяемых грибом в момент заражения. Последовательности нуклеотидов этих РНК были комплементарны большому количеству растительных генов, что указывает на их многофункциональность. Большая часть таких генов включена в процессы транспорта ацил-КоА, биосинтеза убихинона, прорастания семян у пшеницы и макромолекулярный катаболизм у ячменя [11].

М. Derbyshire и соавт. [36] отмечали, что гриб *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, поражающий огромное количество сельскохозяйственных культур, продуцирует в высокой концентрации малые РНК, направленные на подавление некоторых иммунных и сигнальных процессов в растениях. При этом в зависимости от растения-хозяина меняются целевые гены.

Н. Feng и соавт. [44] определили, что малые РНК гриба *Blumeria graminis* Speer воздействуют на процессы передачи сигнала и обмена энергии в клетках пшеницы, что может быть связано с получением питательных веществ от хозяина или с подавлением запрограммированного механизма гибели клеток. Мишеней малых РНК, участвующих в иммунном ответе пшеницы, пока выявлено не было [44].

М. Derbyshire и соавт., изучая малые РНК *S. sclerotiorum*, отмечают, что почти все их локусы были связаны с ретротранспозонами. Как и последовательности генов эффекторов, они находились вне кодируемой области генома, при этом область, включающая эти локусы, была более полиморфной, что говорит о быстро эволюционирующей совокупности малых РНК-эффекторов, связанных с мобильными элементами генома. Такой полиморфизм указывает, что данные области являются важным компонентом эволюции при приспособлении патогена к широкому ряду растений-хозяев. Возможно, случайное действие малых РНК на иммунитет хозяина дает патогену селективное преимущество. Малые РНК, оказывающие значительное влияние на процесс заражения, получили название рибонуклеиновых эффекторов [36].

При исследовании заболеваний пшеницы В. Wang и соавт. [8] обнаружили, что микроРНК-подобная РНК (milРНК), синтезируемая грибом

*P. striiformis*, смогла подавить защитные реакции растения. Данная РНК принимает участие в «междолевой» РНК-интерференции, воздействуя на экспрессию гена *PR2* ( $\beta$ -1,3-глюканаза) в пшенице. Подавление синтеза предшественника milРНК привело к повышению устойчивости пшеницы к вирулентному штамму *P. striiformis*, а снижение экспрессии *PR2* — к усилению чувствительности растения к авирулентному штамму патогена. В результате был сделан вывод, что данная РНК является важным фактором вирулентности гриба [8].

При колонизации растения грибами иммунная система первого распознает этот момент и запускает цепь защитных реакций. Такие реакции индуцируются молекулярными структурами, ассоциированными с патогеном (pathogen-associated molecular patterns — PAMPs), включающими синтез антимикробных соединений. Одними из таких соединений являются белки, связанные с патогенезом (pathogenesis related — PR), например протеиназы, хитиназы и глюканазы, повреждающие структуру патогена [49].

В свою очередь патогены направляют эффекторы в клетки хозяина для подавления РAMP-активируемого иммунитета (PAMP-triggered immunity — PTI). В ответ в организме растения возникает эффектор-активируемая устойчивость (effector triggered immunity — ETI), представляющая собой второй индуцируемый уровень защиты. Малые РНК патогенов могут оказывать значительное влияние на эффектор-активируемую устойчивость растения. Они могут косвенно усиливать вирулентность патогена с помощью регулирования уровня экспрессии эффекторов. Например, малые РНК регулируют синтез фермента авирулентности 1, являющегося эффектором (avirulence conferring enzyme-1 — ACE1) у *Magnaporthe oryzae* Couch, который регулирует проникновение апрессорий в ткань растения [50, 51]. Кроме того, D. Qutob и соавт. [52] отметили, что некоторые патогены могут синтезировать малые РНК для того, чтобы не быть обнаруженными защитной системой растения-хозяина.

#### **ИММУННЫЙ ОТВЕТ РАСТЕНИЙ НА ЗАРАЖЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ МАЛЫХ РНК**

Т. Zhang и соавт. [28] описали новую консервативную стратегию защиты растений от грибов и оомицетов с помощью малых РНК, направленных

на подавление экспрессии генов вирулентности. Они выделили общий пул малых РНК из гриба *V. dahliae*, взятого из зараженного материала хлопчатника и провели глубокое секвенирование. Оказалось, что большое количество малых РНК невозможно было связать с геномом патогена. Вместо этого примерно 28 малых РНК были идентичны геному хлопчатника. Использование Нозерн-блоттинга показало, что эти малые РНК отсутствовали в грибном материале, полученном в системе *in vitro*. Соответственно без предварительного культивирования гриба на растении появление этих молекул в грибном организме невозможно. Однако в корнях хлопчатника и *A. thaliana* было найдено большое количество исследуемых малых РНК после заражения грибом. Из этих данных следует, что малые РНК растительного происхождения в высокой концентрации были каким-то образом направлены в гифы гриба после заражения. В дальнейшем было выявлено, что большая часть малых РНК, экспортированных из растений хлопчатника, действовала на гены вирулентности *V. dahliae*, способствуя тем самым развитию устойчивости к грибу [28].

При изучении геномов *Triticum aestivum* L., *Aegilops sharonensis* Eig, *Aegilops speltoides* Tausch, *Aegilops tauschii* Coss., *Triticum monococcum* L. и *Triticum urartu* Thumanjan ex Gandilyan было идентифицировано более 200 новых семейств miРНК [53].

S. Dutta и соавт. [29] описали в пшенице новый локус, продуцирующий tasiРНК (tasiRNA producing locus — TAS) при заражении растения стеблевой ржавчиной. Данный локус способен генерировать четыре вида малых РНК, которые в свою очередь действуют на  $\alpha$ -глиадин, лейцин-богатый повтор (leucine-rich repeat — LRR), трансмембранные белки, глутатион-S-трансферазу (glutathione S-transferase — GST) и десатуразы жирных кислот, синтезируемые во время стресса и необходимые для нормального роста и развития растений. Белок  $\alpha$ -глиадин влияет на прорастание зерен пшеницы и рост проростков, и при его отсутствии происходит заметное ухудшение качества белка [29, 54].

Домен LRR присутствует в киназах клеточной мембраны растений и имеет способность узнавать и специфически связываться с эффекторами

патогена. По-видимому, при биотическом стрессе у растения появляется необходимость избавиться от избыточных лейцин-богатых повторов [55].

Трансмембранные белки — это семейство белков, которое участвует в переносе молекул между смежными клетками. На них также влияют различные внешние раздражители, в ответ на которые они активируют каскад реакций. Известно также, что эти белки могут выступать как фактор чувствительности при заражении, поэтому подавление их экспрессии способствует усилению устойчивости растения [56].

Реакции растений на действия стрессовых факторов связаны с образованием активных форм кислорода (АФК) [57], которые принимают участие в ряде клеточных процессов и индуцируют смерть клеток [58]. Глутатион-S-трансфераза образует хелаты активных форм кислорода (органические пероксиды) и, подавляя окислительное повреждение тканей, контролирует некроз [59]. Под влиянием соответствующей siРНК происходит ингибирование фермента GST, и возникающий при этом некроз зараженных тканей ограничивает распространение инфекции на здоровые участки.

Десатуразы жирных кислот преобразуют насыщенные жирные кислоты в ненасыщенные, что влияет на подвижность мембран и, в конечном счете, на механизм передачи сигналов между клетками [60], а синтезируемые АФК усиливают интенсивность контролируемых ими сигналов.

A. Canto-Pastor и соавт. [13] показали, что семейство miРНК снижает экспрессию белков лейцин-богатых повторов нуклеотид-связывающего сайта (nucleotide binding site leucine-rich repeat — NLR). Малые РНК семейства miR482/2118 имеют несколько функций. Они участвуют в расщеплении мРНК и активируют вторичный синтез малых интерферирующих РНК, используя целевую РНК в качестве матрицы.

Действие miR482 направлено на консервативный мотив разнообразных мРНК лейцин-богатых повторов нуклеотид-связывающего сайта, а действие miR2118b — на некодирующую РНК, образуемую перегруппировкой нескольких различных генов NLR. Линии томата, синтезирующие короткие tandemные целевые мимические РНК (short tandem target mimic RNA — STTM RNA), которые воздействуют на различные гены,

показали повышенную устойчивость при заражении оомицетами и бактериями. При этом белки NLR принимают участие в формировании количественной устойчивости. А. Canto-Pastor и соавт. [13] также предоставили информацию об использовании STTM-РНК в биотехнологии для усиления количественной устойчивости некоторых сортов.

### САЙЛЕНСИНГ, ИНДУЦИРУЕМЫЙ РАСТЕНИЕМ-ХОЗЯИНОМ (HIGS)

В настоящее время при изучении взаимодействия хозяин-патоген широко используется технология HIGS (host-induced gene silencing — сайленсинг, индуцируемый растением-хозяином), в основе которой лежит создание трансгенных растений, способных секретировать самостоятельно целевые молекулы дцРНК, направленные на подавление экспрессии определенного гена соответствующего микроорганизма.

Стратегия HIGS была эффективно применена на растениях, поражаемых нематодами [61], насекомыми [62, 63], грибами [5, 26, 64] и оомицетами [65, 66]. Такая система может быть легко адаптирована для одновременного контроля нескольких патогенов путем подавления экспрессии важных генов вирулентности [26]. Тем не менее одним из ограничений использования HIGS является проведение успешной стабильной генетической трансформации растений, что пока невозможно для многих хозяйственно важных культур. Кроме того, у общества все еще есть опасения по поводу потребления продуктов, полученных из генно-инженерно-модифицированных растений [21], выращивание которых находится под запретом в России и во многих других странах.

Нужно сказать, что механизм HIGS, хотя и контролируемый человеком, — отличный пример переноса малых РНК от хозяев к патогенным микроорганизмам или вредителям [8, 61–64, 67].

Одна из вариаций HIGS — VIGS (virus-induced gene silencing — вирус-индуцированный сайленсинг генов), при котором синтез двухцепочечных молекул в растениях осуществляется транзистентно с помощью вирусов. При этом вирус выполняет функцию дополнительного фактора, обеспечивающего образование целевых дцРНК. Это позволяет избежать необходимости проведе-

ния генетической трансформации растений, но в то же время оценить вирулентность возбудителей заболеваний при подавлении экспрессии одного или нескольких генов, отвечающих за их жизнедеятельность. Работа с такой технологией велась порядка нескольких десятилетий и позволила продвинуться в изучении генетического взаимодействия многих патосистем. Вначале проводят заражение растения вирусной конструкцией, содержащей целевую последовательность и обеспечивающей образование двухцепочечных молекул. В том случае, когда заражение прошло эффективно и наблюдается стабильный синтез дцРНК, приступают к следующему шагу, а именно к заражению изучаемым патогеном или вредителем. Эффективность использования VIGS меняется от растения к растению, а взаимодействие трех биологических единиц (растения, вируса и исследуемого возбудителя заболеваний) может привести к неоднозначным результатам [68]. Следует помнить, что даже модифицированный вирус будет для растения стресс-фактором, который приведет к возникновению специфических защитных реакций еще до инфицирования соответствующим возбудителем заболевания. Без сомнения, такое растение будет отличаться от полностью здорового, не подверженного воздействию вируса. В состоянии стресса иммунитет растения начинает работать в полную силу и при поражении вторым патогеном результат такого взаимодействия может быть неоднозначным. Использование этой технологии в поле экономически нецелесообразно, к тому же существует опасность выхода генно-модифицированного вируса в окружающую среду.

Многие облигатные паразитирующие микроорганизмы поглощают питательные вещества растения-хозяина через специальные органы, называемые гаусториями и гифами. X. Zhu и соавт. [69] изучали развитие возбудителя желтой ржавчины *P. striiformis* var. *tritici* на пшенице (*T. aestivum*). Митоген-активируемая белковая киназа-киназа (МАРКК) кодируется геном *PsFUZ7* и регулирует образование гаусторий и инвазивный рост. Был охарактеризован ген *PsKPP4*, гомологичный гену *STE11* (МАРККК) в дрожжах. Так же, как и в случае с сайленсингом *PsFUZ7*, было проанализировано снижение экспрессии *PsKPP4* в гифах и гаусториях, которое привело к снижению

агрессивности гриба. Урединиоспоры *P. striiformis*, обработанные ингибитором экспрессии *STE11*, формировали деформированные ростковые трубочки. Повышенная экспрессия *PsKPP4* в дрожжах при делении привела к синтезу веретеновидных клеток и повышенной устойчивости клеток дрожжей к окислительному стрессу [69].

А. Koch и соавт. [5] снизили экспрессию гена *CYP51*, который необходим для биосинтеза эргостерола, и оценили влияние сайленсинга на рост *F. graminearum*. При внесении дцРНК, комплементарной гену *CYP51*, в жидкую культуру *F. graminearum* было отмечено подавление роста гриба и изменение его морфологических показателей, что очень похоже на эффект от применения фунгицида тебуконазола. Создание трансгенных линий *A. thaliana* и ячменя, экспрессирующих дцРНК, привело к значительному повышению устойчивости обычно чувствительных генотипов. Рост мицелия был ограничен в местах инокуляции патогена, а инокулированные зерновки ячменя были практически свободны от гиф гриба. Подавление роста гриба имело положительную корреляцию с синтезом малых РНК и эффективностью сайленсинга *CYP51* [5].

W. Cheng и др. [70] определили, что подавление экспрессии хитинсинтазы гриба *F. graminearum* увеличило устойчивость трансгенных растений пшеницы. Данный фермент играет большую роль в жизнедеятельности гриба. Экспрессия трех конструкций РНК в двух различных сортах трансгенной пшеницы обеспечила высокую устойчивость культуры к фузариозу колоса и развитию гриба на всходах у поколений Т3-Т5. Ограничение в росте патогена было также подтверждено с помощью конфокальной микроскопии.

### **SIGS В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ: ЗНАЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ**

В 2016 г. была предложена новая система искусственного индуцирования РНК-интерференции — SIGS (spray-induced gene silencing — спрей-индуцированный сайленсинг генов). Суть ее заключалась в простом внесении дцРНК в жидкую питательную среду с микроорганизмами или распылении ее по поверхности твердого объекта, например листа [17]. Это открытие позволило заговорить о новой стратегии защиты растений и замене пестицидов.

Распыленная на листья дцРНК достигает вначале апопласт, ксилему и в дальнейшем перемещается в симпласт. Было продемонстрировано акропетальное перемещение сигнала сайленсинга, которое привело к ингибированию роста гриба в областях, на которые дцРНК не попала, что говорит о высокой эффективности двухцепочечных молекул [17].

Использование дцРНК имеет множество преимуществ перед химическими препаратами. Препараты на основе дцРНК могут действовать специфически против определенного патогена, имеющего гомологическую последовательность в геноме. В процессе эволюции патогенов и возникновения у них устойчивости к дцРНК возможным решением может быть использование смеси различных молекул дцРНК, действие которых будет направлено на различные области гена или даже на разные гены. Разработка таких препаратов должна проводиться с учетом полезной микрофлоры, воздействующей на растение. Несмотря на то что микроорганизмы относятся к разным видам, они могут иметь гомологичные последовательности в геномах, особенно если речь идет о генах «домашнего хозяйства». Внесение дцРНК на основе таких последовательностей может привести к неспецифическому ингибирующему воздействию на микроорганизмы почвы и симбионты [17].

Необходимо также отметить экологичность таких препаратов. В отличие от химикатов, дцРНК представляет собой биологический объект, который является природным компонентом и довольно быстро деградирует [71]. В организме растений и животных дцРНК проходит через цепочку реакций, приводящих к ее расщеплению на более короткие молекулы, которые впоследствии также подвергаются естественной деградации [72]. А это говорит, что распыление дцРНК не приведет к возникновению каких-либо новых остаточных соединений в пище [71].

Применение дцРНК в защите растений требует серьезного подхода, обсуждений и исследований. Необходимо рассчитать и оптимизировать стоимость производства дцРНК, улучшить ее стабильность. Поэтому сейчас актуальны исследования по созданию дешевых систем, стабильно синтезирующих дцРНК хорошего качества [71].

До настоящего момента основным способом синтеза дцРНК являлось объединение двух разнонаправленных цепей РНК, синтезированных с помощью ферментов, в одну двухцепочечную молекулу. Такая гибридизация цепей проводилась либо *in vitro* [17, 26, 73–75], либо *in vivo* после синтеза одноцепочечных РНК (оцРНК) в клетках бактерии в отсутствие РНКазы III [76–78]. Нужно сказать, что зачастую физическая гибридизация двух комплементарных цепей *in vitro*, и особенно *in vivo*, приводит к низкой концентрации двухцепочечных молекул, полностью и правильно дублированных. К тому же бактериальные системы содержат гомологичные молекулы ДНК, что влияет на качество и эффективность конечных молекул РНК.

А. Niehl и соавт. [79] утверждают, что наиболее эффективным является синтез дцРНК с помощью ферментов, выделенных из вирусов, способных продуцировать двухцепочечные молекулы естественным образом. Они разработали систему репликации дцРНК в бактерии *Pseudomonas syringae* Van Hall с использованием компонентов бактериофага ϕ16, позволяющую синтезировать большие молекулы РНК высокого качества в больших количествах. Стабильность синтеза дцРНК была достигнута путем объединения трех определенных сегментов генома бактериофага в векторе и поддержании природного размера дцРНК и элементов, необходимых для эффективной репликации и упаковки сегментов. Такая система может быть легко адаптирована для синтеза различных целевых последовательностей [79]. Синтез больших молекул дцРНК (>2600 п. н.) позволяет получить в итоге большой пул специфичных малых РНК. Технология была разработана для повышения стабильности дцРНК после опрыскивания до 20 дней и более [79, 80].

### ОГРАНИЧЕНИЯ SIGS-СТРАТЕГИИ

Благодаря своей структуре дцРНК более стабильна, чем одноцепочечные молекулы, хотя и ее срок жизни ограничен присутствием различных РНКаз, количество и тип которых меняются в зависимости от среды, в которой дцРНК находится, что напрямую влияет на скорость деградации молекулы [81]. I.K. Singh и соавт. [82] продемонстрировали, что скорость расщепления и переработки дцРНК существенно варьировала у раз-

личных видов насекомых. X.-S. Song и соавт. [71] указывали, что после распыления на растениях стабильность дцРНК сохраняется только в течение 8 дней.

При разработке мер защиты растений против отдельного патогена необходимо убедиться в способности этого организма осуществлять РНК-интерференцию. Отсутствие тех или иных компонентов РНК-интерференции в клетках некоторых патогенов сделают этот метод неэффективным.

При синтезе дцРНК необходимо учитывать возникновение нецелевого сайленсинга, когда образуемая в итоге малая РНК комплементарна или частично комплементарна одной или несколькими мРНК, не являющимся целью сайленсинга [83, 84].

А. Koch и соавт. [17] использовали распыление дцРНК в системе *F. graminearum*—ячмень. Продолжая свою работу, начатую в 2013 г., они смогли доказать, что распыление дцРНК, нацеленной на три гена-паралога *CYP51*, привело к снижению роста гриба. Было показано, что дцРНК распространялась по проводящей системе растения и в итоге была поглощена грибом через ткани листа. Передвижение малых РНК по проводящей системе растения представляет собой очень медленный и неэффективный процесс. Поэтому при разработке специальных препаратов более правильным выбором может быть использование больших молекул [17].

X.-S. Song и соавт. [71] использовали механизм SIGS для подавления экспрессии гена миозин-5 (*MYO5*) на грибе *Fusarium asiaticum* O'Donnell, Aoki, Kistler, Geiser. Молекулы дцРНК, комплементарные нескольким регионам целевого гена, приводили к возникновению дефектов клеточных стенок, оказывая непосредственное влияние на рост мицелия, жизнедеятельность и вирулентность гриба. Для того чтобы определить продолжительность РНК-интерференции, была проведена оценка скорости роста мицелия гриба после удаления дцРНК из питательной среды. В течение первых 5 ч после удаления дцРНК скорость роста мицелия гриба была сравнима с таковой на среде, постоянно снабжаемой дцРНК, что говорит об эффективном подавлении экспрессии гена *MYO5*. В период с 5 до 9 ч скорость роста мицелия постепенно увеличивалась, а после 9 ч — была

сравнима с контролем. Поскольку *F. asiaticum* не способен поддерживать синтез вторичных малых РНК, экспрессия целевого гена восстанавливалась после того, как все молекулы экзогенной дцРНК были использованы в РНК-интерференции. При постоянном поступлении дцРНК в питательную среду ингибирование экспрессии гена *MYO5* могло длиться 7 дней [71].

Стабильность молекул РНК на поверхности растений составляет примерно неделю, что в некоторых случаях недостаточно для контроля патогенов [71]. Однако, в отличие от грибов, в растительном организме siРНК могут быть вторично амплифицированы и, таким образом, размножены [85]. Концентрация вторичных малых РНК намного выше, чем первичных, и они способны значительно снизить уровень экспрессии соответствующего гена [86]. Так, антигрибная активность дцРНК была выше и длилась дольше при попадании сначала в растения и только после этого в гриб по сравнению с эффектом молекул, находящихся на поверхности органов пшеницы. При этом дцРНК наиболее эффективно проникают внутрь растения через повреждения [71].

Было продемонстрировано, что молекулы дцРНК, комплементарные различным областям одного гена, могут иметь разное влияние на биологические процессы. После распыления дцРНК либо высыхает на поверхности растения, либо всасывается растительными клетками. Когда растение поражается грибом, дцРНК, находящаяся на поверхности, не может быть перенесена к участкам заражения по проводящей ткани. Она может быть поглощена клетками гриба, только если патоген попадает на область распыления молекул, но в этом случае эффект длится недолго, поскольку гриб не способен амплифицировать малые РНК [71].

Метод SIGS также был использован для борьбы с насекомыми-вредителями. Нанесение соответствующих дцРНК на растения значительно увеличило смертность и ухудшило рост насекомых [87–90]. Такой эффект может быть достигнут не только при попадании молекул на надземные части растений, но и в корнях [21].

Недавнее исследование показало, что стабильность дцРНК была увеличена примерно до 20 дней при ее напылении на наночастицы BioClay [80].

Эти частицы снижали скорость деградации дцРНК под действием РНКаз или солнечного света и препятствовали ее быстрому смыванию с поверхности листа. Поскольку наночастицы не обладают токсическим действием и легко разлагаются, этот метод не будет оказывать отрицательного влияния на окружающую среду и может быть применен в поле для контроля болезней и вредителей [21].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

РНК-интерференция показала себя как эффективное средство изучения взаимодействия между несколькими организмами и инструмент разработки новых мер защиты растений. Были открыты и описаны несколько типов малых РНК, а также их обмен между разными видами. Такая коммуникация развилась у видов в процессе эволюции и адаптации к источникам питания и, по-видимому, существует между многими взаимодействующими организмами. Малые РНК являются естественным компонентом клетки и участвуют в различных процессах, направленных на поддержание ее жизнедеятельности. Некоторые малые РНК патогенов получили название рибонуклеиновых эффекторов, так как действуют против иммунитета хозяина. Использование HIGS и VIGS продвинуло исследователей в понимании формирования устойчивости у одних организмов и вирулентности — у других. Особое значение принимает новая система SIGS, эффективность которой может превосходить действие многих пестицидов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(2):126-139. <https://doi.org/10.1038/nrm2632>.
2. Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature.* 2004;431(7006):356-363. <https://doi.org/10.1038/nature02874>.
3. Vaucheret H, Vazquez F, Cr  t   P, et al. The action of Argonaute1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev.* 2004;18(10):1187-1197. <https://doi.org/10.1101/gad.1201404>.
4. Brodersen P, Voinnet O. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet.*

- 2006;22(5):268-280. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.03.003>.
5. Koch A, Kumar N, Weber L, et al. Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 $\alpha$ -demethylase-encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(48):19324-19329. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306373110>.
  6. Lee HC, Li L, Gu W, et al. Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi. *Mol Cell*. 2010;38(6):803-814. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.04.005>.
  7. Weiberg A, Wang M, Bellinger M, et al. Small RNAs: a new paradigm in plant-microbe interactions. *Annu Rev Phytopathol*. 2014;52:495-516. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045933>.
  8. Wang B, Sun Y, Song N, et al. *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* microRNA-like RNA 1 (*Pst*-miR1), an important pathogenicity factor of *Pst*, impairs wheat resistance to *Pst* by suppressing the wheat pathogenesis-related 2 gene. *New Phytol*. 2017;215(1):338-350. <https://doi.org/10.1111/nph.14577>.
  9. Cerutti H, Casas-Mollano JA. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr Genet*. 2006;50(2):81-99. <https://doi.org/10.1007/s00294-006-0078-x>.
  10. Laurie JD, Linning R, Bakkeren G. Hallmarks of RNA silencing are found in the smut fungus *Ustilago hordei* but not in its close relative *Ustilago maydis*. *Curr Genet*. 2008;53(1):49-58. <https://doi.org/10.1007/s00294-007-0165-7>.
  11. Kusch S, Frantzeskakis L, Thieron H, et al. Small RNAs from cereal powdery mildew pathogens may target host plant genes. *Fungal Biol*. 2018;122(11):1050-1063. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.08.008>.
  12. Nicolás FE, Garre V. RNA interference in fungi: retention and loss. *Microbiol Spectr*. 2016;4(6). <https://doi.org/10.1128/microbiol-spec.funk-0008-2016>.
  13. Canto-Pastor A, Santos BA, Valli AA, et al. Enhanced resistance to bacterial and oomycete pathogens by short tandem target mimic RNAs in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116(7):2755-2760. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814380116>.
  14. Pak J, Fire A. Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*. *Science*. 2007;315(5809):241-244. <https://doi.org/10.1126/science.1132839>.
  15. Molnar A, Melnyk CW, Bassett A, et al. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science*. 2010;328(5980):872-875. <https://doi.org/10.1126/science.1187959>.
  16. Lewsey MG, Hardcastle TJ, Melnyk CW, et al. Mobile small RNAs regulate genome-wide DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(6):E801-E810. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515072113>.
  17. Koch A, Biedenkopf D, Furch A, et al. An RNAi-Based Control of *Fusarium graminearum* infections through spraying of long dsRNAs involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery. *PLoS Pathog*. 2016;12(10):e1005901. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005901>.
  18. Ding B. The biology of viroid-host interactions. *Annu Rev Phytopathol*. 2009;47:105-131. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081927>.
  19. Buhtz A, Springer F, Chappell L, et al. Identification and characterization of small RNAs from the phloem of *Brassica napus*. *Plant J*. 2008;53(5):739-749. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2007.03368.x>.
  20. Weiberg A, Jin H. Small RNAs – the secret agents in the plant-pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol*. 2015;26:87-94. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.033>.
  21. Wang M, Thomas N, Jin H. Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi for powerful innovative pre- and post-harvest plant protection. *Curr Opin Plant Biol*. 2017;38:133-141. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.05.003>.
  22. Weiberg A, Bellinger M, Jin H. Conversations between kingdoms: small RNAs. *Curr Opin Biotechnol*. 2015;32:207-215. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.12.025>.
  23. Wang M, Weiberg A, Dellota E, et al. Botrytis small RNA Bc-siR37 suppresses plant defense genes by cross-kingdom RNAi. *RNA Biol*. 2017;14(4):421-428. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1291112>.

24. Weiberg A, Wang M, Lin FM, et al. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science*. 2013;342(6154):118-123. <https://doi.org/10.1126/science.1239705>.
25. Buck AH, Coakley G, Simbari F, et al. Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nat Commun*. 2014;5(1):5488. <https://doi.org/10.1038/ncomms6488>.
26. Wang M, Weiberg A, Lin FM. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nat Plants*. 2016;2:16151. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.151>.
27. Shahid S, Kim G, Johnson NR et al. MicroRNAs from the parasitic plant *Cuscuta campestris* target host messenger RNAs. *Nature*. 2018;553(7686):82-85. <https://doi.org/10.1038/nature25027>.
28. Zhang T, Zhao YL, Zhao JH, et al. Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen. *Nat Plants*. 2016;2:16153. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.153>.
29. Dutta S, Kumar D, Jha S, et al. Identification and molecular characterization of a trans-acting small interfering RNA producing locus regulating leaf rust responsive gene expression in wheat (*Triticum aestivum* L.) *Planta*. 2017;246(5):939-957. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2744-2>.
30. Ghildiyal M, Xu J, Seitz H, et al. Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs partitions microRNA strands into the RNA interference pathway. *RNA*. 2010;16(1):43-56. <https://doi.org/10.1261/rna.1972910>.
31. Mi S, Cai T, Hu Y, et al. Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* Argonaute Complexes is directed by the 5'-terminal nucleotide. *Cell*. 2008;133(1):116-127. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.034>.
32. Mueth NA, Ramachandran SR, Hulbert SH. Small RNAs from the wheat stripe rust fungus (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*). *BMC Genomics*. 2015;16(1):718. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1895-4>.
33. Shapulatov UM, Buriev ZT, Ulloa M, et al. Characterization of small RNAs and their targets from *Fusarium oxysporum* infected and noninfected cotton root tissues. *Plant Mol Biol Report*. 2016;34(3):698-706. <https://doi.org/10.1007/s11105-015-0945-z>.
34. Yang F. Genome-wide analysis of small RNAs in the wheat pathogenic fungus *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Biol*. 2015;119(7):631-640. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.03.008>.
35. Vetukuri RR, Asman AKM, Tellgren-Roth C, et al. Evidence for small RNAs homologous to effector-encoding genes and transposable elements in the oomycete *Phytophthora infestans*. *PLoS One*. 2012;7(12):e51399. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051399>.
36. Derbyshire M, Mbengue M, Barascud M, et al. Small RNAs from the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* highlight host candidate genes associated with quantitative disease resistance. *Mol Plant Pathol*. 2019;20(9):1279-1297. <https://doi.org/10.1111/mpp.12841>.
37. Baldrich P, Rutter BD, Karimi HZ, et al. Plant extracellular vesicles contain diverse small RNA species and are enriched in 10- to 17-nucleotide "tiny" RNAs. *Plant Cell*. 2019;31(2):315-324. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00872>.
38. Li LC, Okino ST, Zhao H, et al. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(46):17337-17342. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607015103>.
39. Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9(6):654-659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>.
40. Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T-cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*. 2011;2(1):282. <https://doi.org/10.1038/ncomms1285>.
41. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30(1):255-289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>.
42. Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol*.

- 2012;13(5):328-335. <https://doi.org/10.1038/nrm3335>.
43. Cai Q, Qiao L, Wang M, et al. Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science*. 2018;360(6393):1126-1129. <https://doi.org/10.1126/science.aar4142>.
44. Feng H, Wang B, Zhang Q, et al. Exploration of microRNAs and their targets engaging in the resistance interaction between wheat and stripe rust. *Front Plant Sci*. 2015;6:469. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00469>.
45. LaMonte G, Philip N, Reardon J, et al. Translocation of sickle cell erythrocyte microRNAs into *Plasmodium falciparum* inhibits parasite translation and contributes to malaria resistance. *Cell Host Microbe*. 2012;12(2):187-199. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.06.007>.
46. Ashida H, Ogawa M, Kim M, et al. Shigella deploy multiple countermeasures against host innate immune responses. *Curr Opin Microbiol*. 2011;14(1):16-23. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.08.014>.
47. Rafiqi M, Ellis JG, Ludowici VA, et al. Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions. *Curr Opin Plant Biol*. 2012;15(4):477-482. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.05.003>.
48. Bozkurt TO, Schornack S, Banfield MJ, et al. Oomycetes, effectors, and all that jazz. *Curr Opin Plant Biol*. 2012;15(4):483-492. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.03.008>.
49. Muthukrishnan S, Liang GH, Trick HN, et al. Pathogenesis-related proteins and their genes in cereals. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2001;64:93-114.
50. Fudal I, Collemare J, Böhnert HU, et al. Expression of *Magnaporthe grisea* avirulence gene *ACE1* is connected to the initiation of appressorium-mediated penetration. *Eukaryot Cell*. 2007;6(3):546-554. <https://doi.org/10.1128/ec.00330-05>.
51. Raman V, Simon SA, Romag A, et al. Physiological stressors and invasive plant infections alter the small RNA transcriptome of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *BMC Genomics*. 2013;14(1):326. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-326>.
52. Qutob D, Chapman BP, Gijzen M. Transgenerational gene silencing causes gain of virulence in a plant pathogen. *Nat Commun*. 2013;4(1):1349. <https://doi.org/10.1038/ncomms2354>.
53. Alptekin B, Budak H. Wheat miRNA ancestors: evident by transcriptome analysis of A, B, and D genome donors. *Funct Integr Genomics*. 2017;17(2-3):171-187. <https://doi.org/10.1007/s10142-016-0487-y>.
54. Van Herpen TW, Riley M, Sparks C, et al. Detailed analysis of the expression of an alpha-gliadin promoter and the deposition of alpha-gliadin protein during wheat grain development. *Ann Bot*. 2008;102(3):331-342. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn114>.
55. Hohmann U, Lau K, Hothorn M. The structural basis of ligand perception and signal activation by receptor kinases. *Annu Rev Plant Biol*. 2017;68(1):109-137. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-040957>.
56. Zheng Z, Appiano M, Pavan S, et al. Genome-wide study of the tomato *SIMLO* gene family and its functional characterization in response to the powdery mildew fungus *Oidium neolycopersici*. *Front Plant Sci*. 2016;7:380. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00380>.
57. Chojak-Koźniewska J, Linkiewicz A, Sowa S, et al. Interactive effects of salt stress and *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* infection in cucumber: involvement of antioxidant enzymes, abscisic acid and salicylic acid. *Environ Exp Bot*. 2017;136:9-20. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.01.004>.
58. Mittler R. ROS are good. *Trends Plant Sci*. 2017;22(1):11-19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>.
59. Dalton DA, Boniface C, Turner Z, et al. Physiological roles of glutathione-S-transferases in soybean root nodules. *Plant Physiol*. 2009;150(1):521-530. <https://doi.org/10.1104/pp.109.136630>.
60. Menard GN, Moreno JM, Bryant FM, et al. Genome wide analysis of fatty acid desaturation and its response to temperature. *Plant Physiol*. 2017;173(3):1594-1605. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01907>.
61. Huang G, Allen R, Davis EL, et al. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants

- by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(39):14302-14306. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604698103>.
62. Mao YB, Cai WJ, Wang JW, et al. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat Biotechnol*. 2007;25(11):1307-1313. <https://doi.org/10.1038/nbt1352>.
63. Baum JA, Bogaert T, Clinton W, et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat Biotechnol*. 2007;25(11):1322-1326. <https://doi.org/10.1038/nbt1359>.
64. Nowara D, Gay A, Lacomme C, et al. HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *Plant Cell*. 2010;22(9):3130-3141. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.077040>.
65. Vega-Arreguin JC, Jalloh A, Bos JI, et al. Recognition of an Avr3a homologue plays a major role in mediating nonhost resistance to *Phytophthora capsici* in *Nicotiana* species. *Mol Plant Microbe Interact*. 2014;27(8):770-780. <https://doi.org/10.1094/mpmi-01-14-0014-r>.
66. Jahan SN, Asman AK, Corcoran P, et al. Plant-mediated gene silencing restricts growth of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *J Exp Bot*. 2015;66(9):2785-2794. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv094>.
67. Nunes CC, Dean RA. Host-induced gene silencing: a tool for understanding fungal host interaction and for developing novel disease control strategies. *Mol Plant Pathol*. 2012;13(5):519-529. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00766.x>.
68. Lee WS, Hammond-Kosack KE, Kanyuka K. Barley stripe mosaic virus-mediated tools for investigating gene function in cereal plants and their pathogens: virus-induced gene silencing, host-mediated gene silencing, and virus-mediated overexpression of heterologous protein. *Plant Physiol*. 2012;160(2):582-590. <https://doi.org/10.1104/pp.112.203489>.
69. Zhu X, Guo J, He F, et al. Silencing PsKPP4, a MAP kinase kinase kinase gene, reduces pathogenicity of the stripe rust fungus. *Mol Plant Pathol*. 2018;19(12):2590-2602. <https://doi.org/10.1111/mpm.12731>.
70. Cheng W, Song XS, Li HP, 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 Biotechnol J*. 2015;13(9):1335-1345. <https://doi.org/10.1111/pbi.12352>.
71. Song XS, Gu KX, Duan XX, et al. Secondary amplification of siRNA machinery limits the application of spray-induced gene silencing. *Mol Plant Pathol*. 2018;19(12):2543-2560. <https://doi.org/10.1111/mpp.12728>.
72. Cerutti H, Ibrahim F. Turnover of Mature miRNAs and siRNAs in Plants and Algae. *Adv Exp Med Biol*. 2011;700:124-139. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7823-3\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7823-3_11).
73. Carbonell A, Martínez de Alba Á-E, Flores R, et al. Double-stranded RNA interferes in a sequence-specific manner with the infection of representative members of the two viroid families. *Virology*. 2008;371(1):44-53. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.09.031>.
74. Konakalla NC, Kaldis A, Berbati M, et al. Exogenous application of double-stranded RNA molecules from TMV p126 and CP genes confers resistance against TMV in tobacco. *Planta*. 2016;244(4):961-969. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2567-6>.
75. Tenllado F, Díaz-Ruiz JR. Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. *J Virol*. 2001;75(24):12288-12297. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.24.12288-12297.2001>.
76. Gan D, Zhang J, Jiang H, et al. Bacterially expressed dsRNA protects maize against SCMV infection. *Plant Cell Rep*. 2010;29(11):1261-1268. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0911-z>.
77. Tenllado F, Barajas D, Vargas M, et al. Transient expression of homologous hairpin RNA causes interference with plant virus infection and is overcome by a virus encoded suppressor of gene silencing. *Mol Plant Microbe Interact*. 2003;16(2):149-158. <https://doi.org/10.1094/mpmi.2003.16.2.149>.
78. Yin G, Sun Z, Liu N, et al. Production of double-stranded RNA for interference with TMV infection utilizing a bacterial prokaryotic expression system. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;84(2):323-333. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1967-y>.

79. Niehl A, Soininen M, Poranen MM, et al. Synthetic biology approach for plant protection using dsRNA. *Plant Biotechnol J.* 2018;16(9): 1679-1687. <https://doi.org/10.1111/pbi.12904>.
80. Mitter N, Worrall EA, Robinson KE, et al. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nat Plants.* 2017;3:16207. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.207>.
81. Dubelman S, Fischer J, Zapata F, et al. Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils. *PLoS One.* 2014;9(3):e93155. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093155>.
82. Singh IK, Singh S, Mogilicherla K, et al. Comparative analysis of double-stranded RNA degradation and processing in insects. *Sci Rep.* 2017;7(1):17059. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17134-2>.
83. Schussler MD, Alexandersson E, Bienert GP, et al. The effects of the loss of TIP1;1 and TIP1;2 aquaporins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2008;56(5):756-767. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03632.x>.
84. De Souza N. Off-targets in RNAi screens. *Nat Methods.* 2014;11(5):480. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2958>.
85. Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, et al. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev.* 2003;17(1):49-63. <https://doi.org/10.1101/gad.1048103>.
86. Zhang C, Ruvkun G. New insights into siRNA amplification and RNAi. *RNA Biol.* 2012;9(8): 1045-1049. <https://doi.org/10.4161/rna.21246>.
87. Pridgeon JW, Zhao LM, Becnel JJ, et al. Topically applied AaeIAP1 double-stranded RNA kills female adults of *Aedes aegypti*. *J Med Entomol.* 2008;45(3):414-420. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45\[414:taadrk\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[414:taadrk]2.0.co;2).
88. Wang YB, Zhang H, Li H, et al. Second-generation sequencing supplies an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control. *PLoS One.* 2011;6(4): e18644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018644>.
89. Killiny N, Hajeri S, Tiwari S, et al. Double-stranded RNA uptake through topical application, mediates silencing of five CYP4 genes and suppresses insecticide resistance in diaphorina citri. *PLoS One.* 2014;9(10): e110536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110536>.
90. Miguel SK, Scott JG. The next generation of insecticides: dsRNA is stable as a foliar-applied insecticide. *Pest Manag Sci.* 2016;72(4):801-809. <https://doi.org/10.1002/ps.4056>.

✿ Информация об авторах

**Полина Яковлевна Третьякова** — аспирант, кафедра генетики, селекции и семеноводства. ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К.А. Тимирязева», Москва. SPIN: 8930-8251. E-mail: polina.tretiakova@yandex.ru.

**Александр Александрович Соловьев** — д-р биол. наук, заведующий лабораторией маркерной и геномной селекции растений. ФГБНУ «ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии», Москва. SPIN: 3431-5168. E-mail: a.soloviev70@gmail.com.

✿ Authors and affiliations

**Polina Ya. Tretiakova** — PhD student, department of Genetics, Plant Breeding and Seed Production. Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia. SPIN: 8930-8251. E-mail: polina.tretiakova@yandex.ru.

**Aleksandr A. Soloviev** — Doctor of Science, Head of the Laboratory of Marker-Assisted and Genomic Selection of Plants. All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia. SPIN: 3431-5168. E-mail: a.soloviev70@gmail.com.