

УДК 577.152.3

Двуспиральные РНК как средство защиты растений от патогенных организмов и вирусов культивируемых растений

С. Ю. Морозов^{1,2*}, А. Г. Соловьев^{1,2}, Н. О. Калинина^{1,2}, М. Э. Тальянский^{1,3}¹Международная лаборатория «Резистом», Инновационный центр Сколково, Москва, 143026 Россия**²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992 Россия³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

*E-mail: morozov@genebee.msu.su

Поступила в редакцию 14.10.2019

Принята к печати 29.11.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-4-13-21

РЕФЕРАТ Недавние исследования показали, что растения способны успешно экспрессировать искусственные гены, ответственные за синтез двуспиральных РНК (дсРНК) и шпилечных двуспиральных РНК (hpРНК), а также поглощать и процессировать экзогенные дсРНК и hpРНК, чтобы подавить экспрессию генов жизнеобеспечения и вирулентности патогенных вирусов растений, грибов или насекомых. Как эндогенные, так и экзогенные дсРНК процессируются в малые интерферирующие РНК, которые распространяются по растению локально и системно, попадают в патогенные микроорганизмы и индуцируют устойчивость растений к патогенам, опосредованную РНК-интерференцией. Описаны многочисленные примеры разработки новых биотехнологических подходов к защите растений с использованием трансгенных растений и экзогенных дсРНК. В обзоре обобщены результаты применения трансгенов и экзогенных дсРНК для подавления генов вирулентности грибов и насекомых, а также вирусов, и повышения резистентности растений к этим патогенам. Проанализированы современные представления о механизмах процессинга дсРНК и их транспорта в растениях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА двуспиральные РНК, РНК-интерференция, регуляция генов патогенов, трансгенные растения, устойчивость растений, шпилечные РНК, экзогенные дсРНК.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ RISC – РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RNA Induced Silencing Complex); siРНК – малые интерферирующие РНК (small interfering RNA); дсРНК – двуспиральные РНК; hpРНК – шпилечная РНК; HIGS – сайленсинг гена, индуцированный хозяином (Host-Induced Gene Silencing); SIGS – сайленсинг гена, индуцируемый опрыскиванием (Spray-Induced Gene Silencing).

ВВЕДЕНИЕ

РНК-интерференция – эволюционно консервативный внутриклеточный процесс, обеспечивающий особую стратегию регулирования экспрессии генов. Важнейшим аспектом механизма РНК-интерференции является то, что он не изменяет хромосомную первичную структуру целевых генов, но способен значительно ослаблять экспрессию генов и приводить к определенным изменениям фенотипа

клеток и целых организмов [1, 2]. Впервые идея использования участков РНК, комплементарных определенной области мРНК целевого гена, для угнетения экспрессии этого гена была описана в 1984 году [3] как альтернатива классическому генетическому анализу, т.е. получению мутантов, изменяющих первичную структуру генетического локуса. Однако первые опыты по применению антисмысловой РНК для подавления активности генов не приводили к на-

**ООО «Международная лаборатория «Резистом» (ООО «МЛ «Резистом») является участником проекта создания и обеспечения функционирования Инновационного центра Сколково.

дежным позитивным результатам, и механизмы такого подавления не были понятными [4–6]. Термин РНК-интерференция впервые ввели в 1998 году, когда Табага и соавт. показали, что процесс может быть инициирован инкубацией нематод в растворе ген-специфичных двуспиральных фрагментов РНК [7–9]. Однако к тому времени на трансгенных растениях и грибах уже были получены явные указания на роль комплементарных РНК в регуляции экспрессии эндогенных эукариотических генов [10–12].

Принципиально важный результат представлен в работе, опубликованной в 1993 году и посвященной устойчивости трансгенного табака к потивирусу гравировки табака [13]. Была доказана связь выявленной устойчивости с РНК-интерференцией, так как имела место косупрессия трансгена, кодирующего участок вирусного генома, и самого вируса, имеющего РНК-геном. Следовательно, этот процесс должен функционировать именно на уровне РНК. В течение 1990-х годов появилось множество работ о РНК-интерференции во многих организмах, включая грибы, животные и растения [14, 15]. Эти исследования показали, что процесс РНК-интерференции начинается с фермента Dicer-Like (DCL), который разрезает длинные молекулы вирусной или клеточной двуспиральной РНК на короткие фрагменты порядка 21–25 нуклеотидов, называемые siРНК. Одну из двух цепочек каждого фрагмента называют «направляющей», так как она далее включается в состав комплекса RISC. В результате активности этого комплекса короткий одноцепочечный фрагмент РНК образует водородные связи с комплементарной последовательностью протяженной молекулы РНК и вызывает разрезание последней белком комплекса RISC, который был назван Argonaute (AGO). Таким образом обеспечивается высокая специфичность разрезания. Эти события приводят к подавлению (сайленсингу) функционирования клеточного гена или репликации вируса [1, 16].

Передвижение siРНК по растению подразделяют на межклеточный (ближний) и системный (дальний) транспорт [17]. Это движение происходит по симпласту, т.е. от места инициации в соседние клетки через межклеточные каналы, называемые плазмодесмами, а также распространяется системно на большие расстояния через проводящую ткань флоэмы. Системное движение сигнала сайленсинга происходит в течение нескольких дней после инициации и, как правило, направлено от фотосинтетических источников (т.е. листьев) к корням и точкам роста [18, 19]. Системный сигнал сайленсинга идентифицирован в растениях путем прямого отбора проб сока флоэмы [20, 21] и обнаружения его в привитых частях растения [22–24]. Мобильные сигналы сайленсинга включают двуспи-

ральные молекулы siРНК (21–24 остатка) [20, 21, 24, 25]. При этом Dunoyer и соавт. [26] прямо показали, что химически синтезированные экзогенные флуоресцентно меченные siРНК действительно перемещаются от клетки к клетке и на большие расстояния.

Начиная с тех работ, в которых доказано, что искусственные двуспиральные РНК вызывают РНК-интерференцию [9], удалось убедительно показать эффективность использования этой стратегии для защиты растений от патогенных организмов и вирусов [27, 28]. В данном обзоре мы рассмотрим примеры возможного практического применения РНК-интерференции для защиты растений от патогенов.

ЭКСПРЕССИЯ ДВУСПИРАЛЬНЫХ РНК В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ПАТОГЕНОВ

Сейчас очевидно, что РНК-интерференция может использоваться для достижения желаемой резистентности сельскохозяйственных культур к патогенам путем манипулирования экспрессией генов вирусов, бактерий, грибов, нематод и насекомых [29, 30]. Способ доставки двуспиральных РНК, ранее получивший широкое применение для защиты растений, основан на использовании трансгенных культур, продуцирующих dsРНК, специфичные для вредителей. Опосредованный трансгеном метод подавления патогенов в целом включает идентификацию целевого ингибируемого гена(ов) патогена с последующим созданием конструкции, где dsРНК продуцируется в виде шпильки с помощью генно-инженерной кассеты, содержащей целевой ген (или его часть) в смысловой и антисмысловой ориентациях, а также относительно короткий спейсер, разделяющий комплементарные сегменты, трансформацию растений и, наконец, скрининг и оценку признаков трансформантов [31, 32] (рис. 1). Экспрессия таких dsРНК, основанная на трансгенных конструкциях, в соответствующем растении-хозяине часто приводит к защите от инфекции. Этот биотехнологический способ, названный сайленсингом генов, индуцированным хозяином (host-induced gene silencing, HIGS), появился как перспективная альтернатива другим способам защиты растений, поскольку имеет высокую селективность для генов организма цели. Кроме того, этот метод обладает минимальными побочными эффектами по сравнению, например, с трансгенами, продуцирующими белки, или с химической протективной обработкой [29, 33].

За последние 10 лет опубликован целый ряд исследований, посвященных использованию HIGS для борьбы с грибковыми заболеваниями [29, 33, 34]. В 2010 году была опубликована важная работа, доказывающая эффективность стратегии

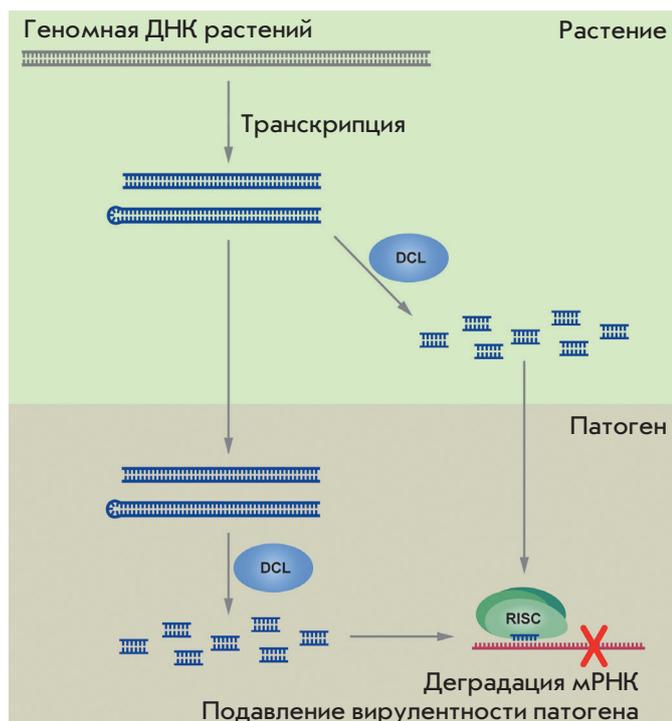


Рис. 1. Схема использования трансгенной дсРНК для РНК-интерференции в растениях. Искусственная дсРНК производится с трансгенных конструкций. Эндогенные длинные дсРНК либо транспортируются прямо в цитоплазму патогена по не вполне ясному механизму, либо молекулы дсРНК или hrРНК распознаются в растении рибонуклеазой DICER (DCL), которая расщепляет длинные дсРНК на короткие интерферирующие РНК. Последние затем переносятся в клетки патогена, где включаются в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC), который направляет специфическую деградацию или трансляционную репрессию мРНК патогена. Интерферирующие РНК и комплекс RISC могут быть образованы непосредственно в клетках патогена. Стрелки показывают различные шаги процесса индукции коротких интерферирующих РНК и движения РНК между клетками растений и фитопатогенов

HIGS в борьбе с фитопатогенными грибами [35]. Показано, что экспрессия интерферирующей каскады для маркерного гена *GUS*, кодирующего бета-глюкуронидазу (шпилька (hp)GUS), в растениях табака приводила к подавлению экспрессии этого гена в клетках гриба *Fusarium verticillioides*. Однако эффективность HIGS, направленного на возбудитель ржавчины, варьировала при использовании разных генов. Так, например, в трансгенных растениях пшеницы, продуцирующих дуспиральные РНК к генам *MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 1* (*PtMAPK1*), *CYCLOPHILIN* (*PtCYC1*)

или *CALCINEURIN B* (*PtCNB*) ржавчинного гриба *Puccinia triticina* [36], симптомы заболевания уменьшились на 51–68%, а биомасса гриба снизилась на 59–69% по сравнению с контрольными векторными конструкциями. В листьях пшеницы, экспрессирующих эти конструкции, симптомы инфекции *Puccinia graminis* также уменьшились незначительно. Таким образом, очевидно, что специальный подбор генов-мишеней может привести к большей эффективности HIGS и обеспечить более широкий спектр устойчивости к ржавчинным грибам.

Очевидный эффект HIGS показан также у злаковых, зараженных возбудителем мучнистой росы *Blumeria graminis* [37]. Обнаружено снижение симптомов мучнистой росы у растений ячменя или пшеницы при HIGS-опосредованном подавлении гена белка-эффектора *Avra10* и уменьшение количества функциональных гаусторий внутри клеток эпидермиса. Подавление генов метаболизма жирных кислот с помощью стратегии HIGS выявило эффективность этого метода для создания толерантности к болезням и у ряда других культурных растений. HIGS-опосредованное подавление гена *OsSSI2* риса привело к повышению устойчивости к грибу *Magnaporthe grisea* и бактерии листовой гнили *Xanthomonas oryzae* [38]. Повышенная устойчивость растений риса к *M. grisea* была достигнута путем подавления двух генов, а именно *OsFAD7* и *OsFAD8*, которые кодируют белки Ω -3-десатуразы жирных кислот [39]. Более того, подавление генов, контролирующих производство лигнина, привело к повышению устойчивости растений сои к фитопатогену *Sclerotinia sclerotiorum* [40].

В отличие от приведенных данных, HIGS-опосредованный сайленсинг генов оомицета *Phytophthora parasitica* не инициировал развитие столь явной защитной реакции у трансгенных растений арабидопсиса, экспрессирующих дсРНК на основе последовательности гена *PnPMA1* [41]. Однако другие примеры указывают на возможность успешного применения HIGS и в случае оомицетов. Так, в одной из работ показано, что в трансгенных растениях табака, экспрессирующих дсРНК гена глутатион-S-трансферазы, развивается заметная устойчивость к табачному штамму фитопфторы [42].

Проблемы применения трансгенных растений, экспрессирующих дсРНК к генам паразитических нематод, обобщены Lilley и соавт. [43]. Отмечено, что не полностью понятыми остаются сложные взаимодействия между растением и паразитом. В частности, невозможность трансформации паразитических нематод и генерации их мутантных линий не позволяет понять функции генов, что, в свою очередь, затрудняет идентификацию генов, которые могут служить эффективными мишенями

ми для РНК-интерференции. Однако с этой целью можно использовать данные для других клеточных патогенов, в частности соевой нематоды *Heterodera glycines* и грибов. Так, Youssef и соавт. [44] использовали стратегию HIGS для подавления гена *HgALD* (фруктозо-1,6-дифосфат-альдолаза), что приводило к уменьшению численности потомства самок на 58%.

Сайленсинг генов домашнего хозяйства корневой нематоды с помощью экспрессии дсРНК в растении-хозяине также повысил устойчивость к нематоду [45]. Ibrahim и соавт. [46] смогли успешно снизить образование скоплений *Meloidogyne incognita* в корнях сои путем подавления генов, кодирующих тирозинфосфатазу и фруктозо-1,6-дифосфат-альдолазу, ключевой фермент гликолиза.

Альтернативная стратегия HIGS, направленная на борьбу с нематодами, включает гены, необходимые для паразитизма [47, 48]. Гены *flp-14* и *flp-18* галловой нематоды *M. incognita* кодируют нейропептиды, которые вовлечены в миграцию нематод и инвазию корней хозяина [47]. HIGS-опосредованный сайленсинг любого из двух генов в трансгенных растениях табака снижает заражение большинства линий этой нематодой. Плодовитость самок уменьшается на ~50–80%. Паразитизм также может быть нарушен HIGS-опосредованным сайленсингом генов, кодирующих эффекторные белки нематоды, играющие важную роль в установлении успешных паразитарных отношений с хозяином. В трансгенных растениях *Arabidopsis thaliana*, экспрессирующих дсРНК к участкам консервативного эффекторного гена *16D10* корневой нематоды, кодирующего небольшой секреторный пептид, который помогает выбрать места кормления, возникает устойчивость широкого спектра к *M. incognita* [48]. Снижение восприимчивости к *M. incognita* выявлено также в корнях трансгенных растений винограда, экспрессирующих конструкции на основе шпильки фрагмента последовательности гена *16D10* [49]. Sindhu и соавт. [50] использовали подавление четырех разных генов, участвующих в паразитизме нематоды сахарной свеклы (*Heterodera schachtii*) на хозяине *A. thaliana*, который экспрессирует дсРНК. Хотя полная резистентность не была достигнута, но количество зрелых самок нематод в разных линиях трансгенных растений снизилось до 23–64%.

РНК-интерференция применяется также для борьбы с насекомыми-вредителями, которые приводят к значительным потерям урожая [51–53]. Мао и соавт. [54] разработали стратегию, которая контролирует чувствительность насекомого к фитотоксинам растения. После нападения насекомого растения синтезируют разнообразные вторичные метаболиты, направленные на снижение жизне-

способности вредителей. В ответ некоторые насекомые выработали способность к детоксикации этих соединений, что часто обусловлено активностью цитохром-Р450-монооксигеназы. Согласно данным генетического и биохимического анализа, экспрессия цитохрома Р450 (*CYP6AE14*) в личинках хлопкового червя (*Helicoverpa armigera*) необходима для устойчивости к госсиполу – фитотоксину хлопка [54]. При этом у личинок, выращенных на трансгенных растениях арабидопсиса, табака или хлопка, экспрессия дсРНК *CYP6AE14* приводит к снижению синтеза соответствующего белка и повышению чувствительности к госсиполу [54, 55]. Позже эти же авторы показали, что уровень защиты можно повысить путем совместной экспрессии дсРНК *CYP6AE14* и цистеиновой протеазы [56]. Индуцированный растением-хозяином ген дсРНК, вызывающей сайленсинг цитохрома Р450, использовали также для увеличения чувствительности к пиретроиду дельтаметрину, который применяется для борьбы с вредителями хлопка [57]. Эти результаты позволяют предположить, что ориентированные на цитохром Р450 ферментные системы являются эффективной системой для снижения резистентности к пиретроидам.

Сельскохозяйственные культуры, кодирующие гетерологичные белки или сверхэкспрессирующие такие белки, принципиально отличаются от культур, которые кодируют кассеты для синтеза интерферирующих дсРНК. Известно, что РНК не токсичны для людей, тогда как производимые трансгенными растениями чужеродные белки в некоторых случаях могут быть токсичными или аллергенными [58]. Таким образом, трансгенные культуры с генами устойчивости на основе РНК гораздо безопаснее для здоровья человека, чем культуры с избыточной экспрессией белков, и не требуют определения острой пероральной токсичности и оценки переваримости введенного компонента РНК. Некоторые проблемы биобезопасности возникают при использовании трансгенных растений, экспрессирующих дсРНК, поскольку транскрипционный сайленсинг генов путем модификации хроматина может привести к наследственным изменениям, имеющим неблагоприятный эффект. Это вызывает у общественности озабоченность, связанную с безопасностью генетически модифицированных организмов [59]. Более того, во многих странах существуют законодательные ограничения на выращивание трансгенных растений (Law Library of Congress (U.S.). Global Legal Research Directorate. Restrictions on Genetically Modified Organisms; Global Legal Research Center: Washington, DC, USA, 2014, p. 242). Таким образом, разработка новых, экологически безопасных подходов, направленных на повы-

шение устойчивости к вредителям без значительных модификаций генома растений, является важной задачей. Один из таких подходов – редактирование генома с помощью системы CRISPR/Cas. Во-первых, системы CRISPR/Cas могут использоваться для введения точечных мутаций или малых делеций в конкретные гены растений-хозяев, чтобы блокировать механизмы, способствующие распространению патогена в растении. Во-вторых, могут быть разработаны системы CRISPR/Cas для осуществления мутагенеза геномов патогенов. Например, системы CRISPR/Cas9 могут быть нацелены непосредственно на ДНК-или РНК-содержащие вирусы [60].

МЕТОДЫ ДОСТАВКИ ИСКУССТВЕННЫХ ДВУСПИРАЛЬНЫХ РНК В РАСТЕНИЯХ: ПРЯМАЯ ОБРАБОТКА РАСТЕНИЙ дсРНК

Доказано, что методы, основанные на РНК-интерференции, являются эффективной стратегией защиты растений от болезней, вызванных вирусными и клеточными патогенами. Однако возможность широкого применения HIGS остается весьма сомнительной, поскольку получение генно-модифицированных сельскохозяйственных культур занимает достаточно много времени и все еще с недоверием воспринимается общественностью во многих европейских странах.

Поиск альтернативных стратегий был облегчен результатами более ранних исследований, которые показали, что растворы дсРНК могут быть использованы для РНК-интерференции нематоды *Caenorhabditis elegans* [7]. Более того, успешные опыты по подавлению роста и размножения паразитических нематод растений *in planta* доказали, что РНК-интерференция в данном случае может быть перспективным методом снижения жизнеспособности вредителей [43]. В настоящее время такие исследования носят новаторский характер и могут привести к значительному прогрессу в создании основанного на РНК-интерференции подхода к защите растений путем прямого введения экзогенной дсРНК, комплементарной геномам патогенов. Такие исследования позволят прояснить такие важные вопросы, как (i) способы и механистические основы введения дсРНК в растения; (ii) решение проблем транспорта, процессинга и стабильности дсРНК во внешней среде и в клетках; (iii) реализация крупномасштабного производства и очистки экзогенной дсРНК, чтобы сделать такой подход экономически обоснованным. Предложено несколько альтернативных способов доставки дсРНК, которые не предполагают трансформации растений. В частности, дсРНК может быть транслоцирована в сосудистую систему растения (ксилема и флоэма) через корни или путем прямой

инъекции молекул РНК в ствол древесных пород [28, 61–66].

Однако наиболее перспективным в настоящее время считается опрыскивание растений (в основном листьев). Этот метод получил название спрей-индуцированного сайленсинга генов (spray-induced gene silencing (SIGS)). Экзогенные интерферирующие дсРНК могут либо непосредственно поглощаться клетками вредителя, либо сначала переноситься в растительные клетки, а затем переходить в клетки патогена (рис. 2) [64, 67, 68]. В этой связи важно отметить, что локально распыленные РНК также ингибируют вирулентность патогена в дистальных, не обработанных листьях [68, 69]. Очевидно, что эти дсРНК либо более короткие продукты их процессинга способны системно распространяться внутри растений.

Показано, что исходные препараты «голых» дсРНК могут защищать растения от микробных патогенов в течение 10 дней после опрыскивания [64, 67, 68]. Однако недавно показали, что продолжительность защиты от инфекции увеличилась более чем на 20 дней, когда дсРНК включали в нанослой гидроксида, называемые BioClay [69]. Нанослой BioClay предотвращали деградацию дсРНК под действием РНКаз или солнечного света. Поскольку эти наночастицы и РНК в них нетоксичны и легко разлагаются, этот метод считается экологически безопасным, он повышает эффективность применения SIGS для борьбы с болезнями растений в полевых условиях [70]. Так, достижения в области технологии наночастиц заметно улучшили потенциальную эффективность применения SIGS для защиты растений. Кроме того, для инкапсуляции дсРНК и достижения РНК-интерференции использовали также полимеры хитозана. Наночастицы хитозана получали путем самосборки полимера с дсРНК, используя электростатические взаимодействия между положительными и отрицательными зарядами аминокислотных групп в хитозане и фосфатных групп в нуклеиновой кислоте соответственно. Этот метод хорошо подходит для длинных дсРНК. Наночастицы хитозана, которыми обработаны растения, могут попасть в организм вредителей вместе с пищей. Эта система весьма недорогая и высокоэффективная. Кроме того, полимеры хитозана нетоксичны и легко подвергаются биоразложению [63, 69, 71, 72].

Длина экзогенной дсРНК весьма важна для эффективного подавления генов патогенов растений. Длина дсРНК, необходимая для достижения выраженного эффекта, варьирует в зависимости от вида и таксона патогена. Исследования на насекомых показали, что длина дсРНК, необходимая для успешной РНК-интерференции, в большинстве случаев может колебаться от 140 до 500 нуклеотидов. Для вирусов

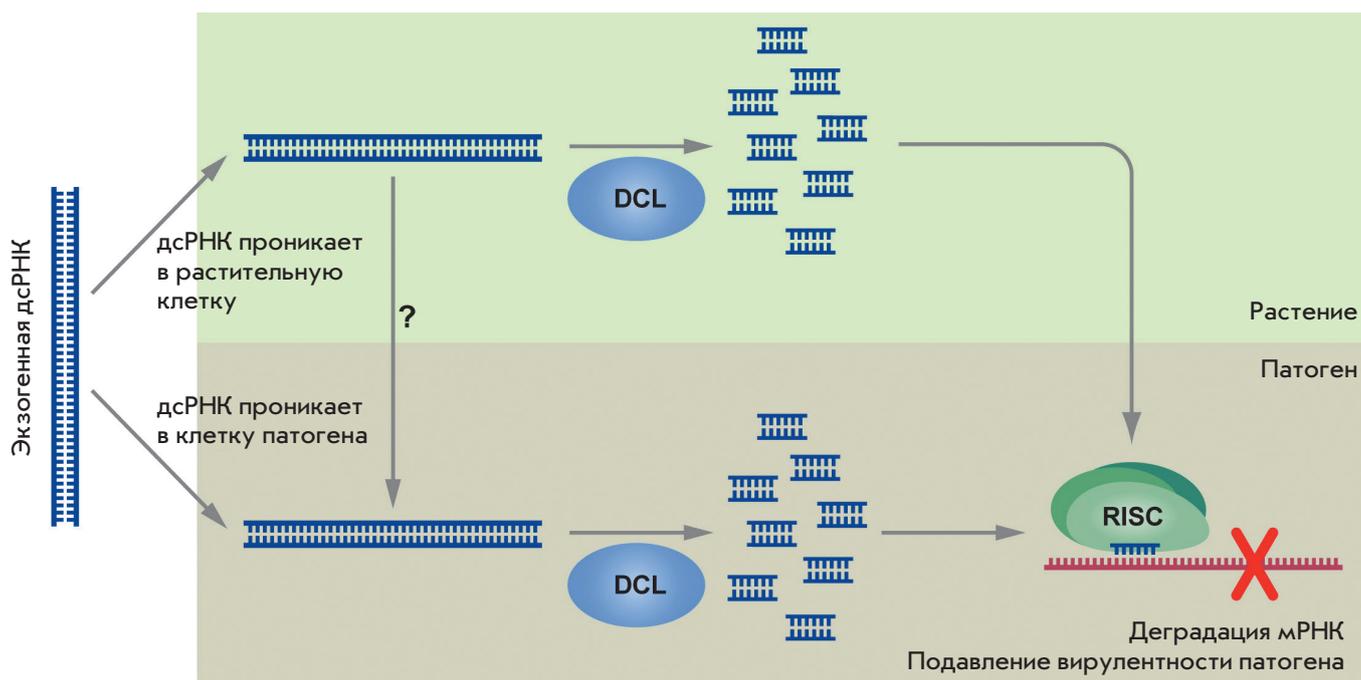


Рис. 2. Схема использования экзогенной дсРНК для индукции РНК-интерференции в растениях. Экзогенная искусственная дсРНК вводится в раствор и наносится на листья растений, цветочные почки, корни или семена. Экзогенные дсРНК захватываются и транспортируются в цитоплазму растений и патогенов с помощью не до конца понятного механизма. Молекулы дсРНК или hpРНК распознаются рибонуклеазой DICER (DCL), которая расщепляет длинные дсРНК на короткие интерферирующие РНК. Последние затем включаются в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC), который направляет специфическую деградацию или трансляционную репрессию мРНК патогена. Стрелки показывают различные шаги процесса индукции коротких интерферирующих РНК и движения РНК между клетками растений и фитопатогенов

этот размер составляет более 200–300 нуклеотидов [28]. В целом, считается, что существует необходимость в скрининге нескольких видов дсРНК разной длины и локализации для каждого конкретного гена. Кроме того, дсРНК может быть как очень специфичной для гена-мишени конкретного вида патогена, так и рассчитанной на более широкий спектр близкородственных видов [69, 71, 72].

Эффективность индукции РНК-интерференции экзогенными дсРНК зависит также от их оптимальной (достаточно высокой) концентрации, что в условиях практического применения требует получения больших количеств дсРНК [73–75]. В экспериментах по РНК-интерференции дсРНК получали *in vitro* с использованием метода двунаправленной транскрипции с помощью T7-полимеразы [76, 77]. Однако очевидно, что такая система не подходит для крупномасштабного производства по экономическим соображениям. Поэтому предложено использовать индуцибельную кассету с промотором РНК-полимеразы фага T7, экспрессирующую дсРНК в штаммах *Escherichia coli* HT115, M-JM109 или M-JM109lacY, дефектные по РНКазе III [78–81]. Кроме того, не-

давно были разработаны стабильные и эффективные системы производства дсРНК в бактериях *Pseudomonas syringae* [82] и дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* [83]. Очевидно, что перечисленные микробиологические системы экспрессии потенциально могут использоваться для масштабного и недорогого получения дсРНК для практического применения SIGS в сельском хозяйстве.

За последние годы показано, что система SIGS может эффективно использоваться для борьбы с фитопатогенными грибами растений. Обнаружено, что нанесение на поверхность листьев дсРНК, синтезированных *in vitro* и направленных против целого ряда генов грибов, ослабляет распространение инфекции путем блокирования роста, изменения морфологии и уменьшения патогенности и приводит к менее выраженным проявлениям болезни [67, 68, 84, 85]. Применение экзогенной дсРНК на поверхности растений, SIGS, в настоящее время рассматривается как инновационная стратегия защиты растений от грибной инфекции [28, 63, 64, 67]. Предполагается, что могут существовать два пути попадания в клетки гриба дсРНК, нанесенных на поверхность расте-

ния: (1) дсРНК после опрыскивания растений сразу проникают в клетки гриба и здесь подвергаются процессингу в siРНК; и (2) РНК попадают в клетки растений, где образуются короткие siРНК, которые транслоцируются в клетки гриба (рис. 2) [67, 68, 86]. Установлено, что эффект сайленсинга гена *Myo5* в *Fusarium asiaticum* сохраняется только в том случае, если дсРНК непрерывно поступает в клетки гриба, так как *F. asiaticum* не способен поддерживать амплификацию вторичных siРНК. Результаты Song и соавт. [86] указывают, что попавшие в растения дсРНК процессируются с образованием siРНК, которые затем амплифицируются растительной РНК-зависимой РНК-полимеразой (RdRP), приводя к образованию вторичных siРНК. Интересно, что согласно [86], дсРНК более эффективно поглощаются через раневую поверхность кончика среза колеоптилей пшеницы, чем через неповрежденную поверхность. Кроме того, проникновение дсРНК усиливалось с помощью неионного поверхностно-активного вещества Silwet L-77 [84].

Многочисленные исследования, проведенные за последние несколько лет, показали, что дсРНК, комплементарные ряду важных генов насекомых-вредителей, могут стать эффективным индуктором SIGS и привести к снижению численности насекомых, скорости их роста и плодовитости, а также к снижению чувствительности к инсектицидам [87]. Обработка листьев искусственно синтезированными дсРНК, нацеленными на гены, связанные с развитием насекомых, ухудшает рост насекомых и значительно снижает их численность [88–92]. Такой эффект может быть достигнут путем орошения корней растений дсРНК, что приводит к эффективному подавлению гена-мишени и аномальному развитию насекомых-вредителей [74, 76, 93]. РНК-интерференция с помощью экзогенных дсРНК может применяться для весьма широкого спектра генов насекомых. Например, подавление экспрессии генов двух АТФ-аз у *Diabrotica undecimpunctata* и *Leptinotarsa decemlineata* приводило к снижению выживаемости насекомых на 40–50% [76]. Смертность капустной моли (*Plutella xylostella*) на листьях, опрысканных дсРНК к генам ацетилхолинэстеразы *Pl. xylostella*, – *AChE1* и *AChE2* – достигала 74 и 89% соответственно [94]. Кроме того, SIGS к генам кислой О-метилтрансферазы ювенильного гормона (juvenile hormone acid O-methyltransferase, JHAMT) и вителогенина существенно снижал уровень этих белков (до 85–90%) у ряда таксономически далеких насекомых [95].

Тонкие механизмы проникновения дсРНК из растений в клетки вредителей в настоящее время

не до конца ясны. Очевидно, что дсРНК прямо проникает в гифы грибов из растительных клеток и межклетников. Менее понятны механизмы действия дсРНК на нематод и насекомых. Естественным является путь первичного проникновения РНК из поглощаемого сока растений в клетки пищеварительного тракта. При этом важную роль играет, возможно, эндоцитоз. Так, у нематод найдены два гена, требуемых для эффективного проникновения дсРНК при питании. Их назвали *Systemic RNAi-deficient (SID)* [64, 67]. Ген *SID-2* кодирует трансмембранный белок, участвующий в достаточно медленном поглощении дсРНК путем эндоцитоза, тогда как продукт гена *SID-1* необходим для быстрого транспорта, не требующего эндоцитоза, и формирует каналы в плазматической мембране [64, 67].

Влияние экзогенного применения дсРНК на сопротивляемость различных видов, включая растения табака, томата и кукурузы, а также папайи и орхидеи, к вирусам проанализировано в ряде экспериментальных исследований. При этом растения обрабатывали либо РНК, синтезированной *in vitro*, либо препаратами нуклеиновых кислот, очищенными из штаммов бактерий, экспрессирующих дсРНК или hrРНК [79, 80, 96, 97]. Оказалось, что дсРНК, нацеленная на гены репликазы вируса или белка оболочки, задерживает развитие заболевания, уменьшает симптомы инфекции и количество зараженных растений, снижает титр вируса [28, 65]. Кроме того, подтверждено, что защитные эффекты, индуцированные дсРНК или hrРНК, сохраняются не менее 20–70 дней после инокуляции вируса [72, 98].

В заключение следует отметить, что SIGS – это весьма целенаправленная и экологически чистая стратегия защиты растений как после, так и до сбора урожая и, очевидно, наименее вредная для здоровья потребителей. Кроме того, поскольку для SIGS часто выбирают консервативные гены патогена, необходимые для его роста или вирулентности, то патогены не в состоянии генерировать достаточное число мутаций в этих важных генах, чтобы избежать воздействия SIGS, сохраняя при этом свои жизненно важные функции. Наконец, необходимо еще раз подчеркнуть, что технология SIGS будет гораздо более приемлема для общественного мнения, чем, например, химические обработки, а ее разработка потребует существенно меньше времени, чем создание стабильных трансгенных культур. ●

Настоящий обзор подготовлен в рамках проекта ООО «МЛ «Резистом», финансируемого в соответствии с Соглашением о предоставлении гранта Фонда «Сколково» № Г18/19 от 26.04.19.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baulcombe D. // *Nature*. 2004. V. 431. P. 356–363.
2. Baulcombe D. // *Plant Cell*. 2019. V. 3. P. 1395–1396.
3. Izant J.G., Weintraub H. // *Cell*. 1984. V. 36. P. 1007–1015.
4. Graessmann M., Michaels G., Berg B., Graessmann A. // *Nucl. Acids Res.* 1991. V. 19. P. 53–58.
5. Pepin M.C., Barden N. // *Mol. Cell. Biol.* 1991. V. 11. P. 1647–1653.
6. Guo S., Kempthues K.J. // *Cell*. 1995. V. 81. P. 611–620.
7. Tabara H., Grishok A., Mello C.C. // *Science*. 1998. V. 282. № 5388. P. 430–431.
8. Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. // *Nature*. 1998. V. 391. № 6669. P. 806–811.
9. Timmons L., Fire A. // *Nature*. 1998. V. 395. № 6705. P. 854.
10. Jorgensen R. // *Trends Biotechnol.* 1990. V. 8. P. 340–344.
11. Grierson D., Fray R.G., Hamilton A.J., Smith C.J.S., Watson C.F. // *Trends Biotechnol.* 1991. V. 9. P. 122–123.
12. Romano N., Macino G. // *Mol. Microbiol.* 1992. V. 6. P. 3343–3353.
13. Lindbo J.A., Silva-Rosales L., Proebsting W.M., Dougherty W.G. // *Plant Cell*. 1993. V. 5. P. 1749–1759.
14. Baulcombe D. // *Science*. 2000. V. 290. № 5494. P. 1108–1109.
15. Matzke M.A., Matzke A.J., Pruss G.J., Vance V.B. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2001. V. 11. P. 221–227.
16. Axtell M.J. // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2013. V. 64. P. 137–159.
17. Melnyk C.W., Molnar A., Baulcombe D.C. // *EMBO J.* 2011. V. 30. P. 3553–3563.
18. Lough T.J., Lucas W.J. // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2006. V. 57. P. 203–232.
19. Voinnet O., Vain P., Angell S., Baulcombe D.C. // *Cell*. 1998. V. 95. P. 177–187.
20. Yoo B.C., Kragler F., Varkonyi-Gasic E., Haywood V., Archer-Evans S., Lee Y.M., Lough T.J., Lucas W.J. // *Plant Cell*. 2004. V. 16. P. 1979–2000.
21. Buhtz A., Springer F., Chappell L., Baulcombe D.C., Kehr J. // *Plant J.* 2008. V. 53. P. 739–749.
22. Palauqui J.C., Elmayan T., Pollien J.M., Vaucheret H. // *EMBO J.* 1997. V. 16. P. 4738–4745.
23. Schwach F., Vaistij F.E., Jones L., Baulcombe D.C. // *Plant Physiol.* 2005. V. 138. P. 1842–1852.
24. Molnar A., Melnyk C.W., Bassett A., Hardcastle T.J., Dunn R., Baulcombe D.C. // *Science*. 2010. V. 328. № 5980. P. 872–875.
25. Hamilton A., Voinnet O., Chappell L., Baulcombe D. // *EMBO J.* 2002. V. 21. P. 4671–4679.
26. Dunoyer P., Schott G., Himber C., Meyer D., Takeda A., Carrington J.C., Voinnet O. // *Science*. 2010. V. 328. № 5980. P. 912–916.
27. Mat Jalaluddin N.S., Othman R.Y., Harikrishna J.A. // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2019. V. 39. P. 67–78.
28. Dubrovina A.S., Kiselev K.V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 9. E2282.
29. Koch A., Kogel K.H. // *Plant Biotechnol. J.* 2014. V. 12. P. 821–831.
30. Kamthan A., Chaudhuri A., Kamthan M., Datta A. // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 208. doi: 10.3389/fpls.2015.00208.
31. Smith E.J., Marié I., Prakash A., García-Sastre A., Levy D.E. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 8951–8957.
32. Wesley S.V., Helliwell C.A., Smith N.A., Wang M.B., Rouse D.T., Liu Q., Gooding P.S., Singh S.P., Abbott D., Stoutjesdijk P.A., et al. // *Plant J.* 2001. V. 27. P. 581–590.
33. Zeng J., Gupta V.K., Jiang Y., Yang B., Gong L., Zhu H. // *Cells*. 2019. V. 8. № 4. E371. doi: 10.3390/cells8040371.
34. Nunes C.C., Dean R.A. // *Mol. Plant Pathol.* 2012. V. 13. P. 519–529.
35. Tinoco M.L., Dias B.B., Dall’Astta R.C., Pamphile J.A., Aragão F.J. // *BMC Biol.* 2010. V. 8. P. 27. doi: 10.1186/1741-7007-8-27.
36. Panwar V., McCallum B., Bakkeren G. // *Plant J.* 2013. V. 73. P. 521–532.
37. Nowara D., Gay A., Lacomme C., Shaw J., Ridout C., Douchkov D., Hensel G., Kumlehn J., Schweizer P. // *Plant Cell*. 2010. V. 22. P. 3130–3141.
38. Jiang C.J., Shimono M., Maeda S., Inoue H., Mori M., Hasegawa M., Sugano S., Takatsuji H. // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2009. V. 22. P. 820–829.
39. Yara A., Yaeno T., Hasegawa M., Seto H., Montillet J.L., Kusumi K., Seo S., Iba K. // *Plant Cell Physiol.* 2007. V. 48. P. 1263–1274.
40. Peltier A.J., Hatfield R.D., Grau C.R. // *Plant Dis.* 2009. V. 93. P. 149–154.
41. Zhang M., Wang Q., Xu K., Meng Y., Quan J., Shan W. // *PLoS One*. 2011. V. 6. e28114. doi: 10.1371/journal.pone.0028114.
42. Hernández I., Chacón O., Rodríguez R., Portieles R., López Y., Pujol M., Borrás-Hidalgo O. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 387. P. 300–304.
43. Lilley C.J., Davies L.J., Urwin P.E. // *Parasitology*. 2012. V. 139. P. 630–640.
44. Youssef R.M., Kim K.H., Haroon S.A., Matthews B.F. // *Exp. Parasitol.* 2013. V. 134. P. 266–274.
45. Gheysen G., Vanholme B. // *Trends Biotechnol.* 2007. V. 25. P. 89–92.
46. Ibrahim H.M., Hosseini P., Alkharouf N.W., Hussein E.H., Gamal El-Din Ael K., Aly M.A., Matthews B.F. // *BMC Genomics*. 2011. V. 12. P. 220. doi: 10.1186/1471-2164-12-220.
47. Papolu P.K., Gantasala N.P., Kamaraju D., Banakar P., Sreevathsa R., Rao U. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 11. e80603. doi: 10.1371/journal.pone.0080603.
48. Huang G., Allen R., Davis E.L., Baum T.J., Hussey R.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 39. P. 14302–14306.
49. Dutta T.K., Banakar P., Rao U. // *Front. Microbiol.* 2015. V. 5. P. 760. doi: 10.3389/fmicb.2014.00760.
50. Sindhu A.S., Maier T.R., Mitchum M.G., Hussey R.S., Davis E.L., Baum T.J. // *J. Exp. Bot.* 2009. V. 60. P. 315–324.
51. Price D.R., Gatehouse J.A. // *Trends Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 393–400.
52. Zhang H., Li H.C., Miao X.X. // *Insect Sci.* 2013. V. 20. P. 15–30.
53. Huvenne H., Smagghe G. // *J. Insect Physiol.* 2010. V. 56. P. 227–235.
54. Mao Y.B., Cai W.J., Wang J.W., Hong G.J., Tao X.Y., Wang L.J., Huang Y.P., Chen X.Y. // *Nat. Biotechnol.* 2007. V. 25. P. 1307–1313.
55. Mao Y.B., Tao X.Y., Xue X.Y., Wang L.J., Chen X.Y. // *Transgenic Res.* 2011. V. 20. P. 665–673.
56. Mao Y.B., Xue X.Y., Tao X.Y., Yang C.Q., Wang L.J., Chen X.Y. // *Plant Mol. Biol.* 2013. V. 83. P. 119–129.
57. Tao S., Zhu L., Lee P., Lee W.M., Knox K., Chen J., Di Y.P., Chen Y. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2012. V. 46. P. 660–667.
58. Astwood J.D., Fuchs R.L. // *Monogr. Allergy*. 1996. V. 32. P. 105–120.
59. Bawa A.S., Anilakumar K.R. // *J. Food Sci. Technol.* 2013. V. 50. P. 1035–1046.
60. Kalinina N.O., Khromov A., Love A.J., Taliansky M. // *Phytopathology*. V. 110. № 1. P. 18–28. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-19-0267-IA>.
61. Timmons L., Court D.L., Fire A. // *Gene*. 2001. V. 263. P. 103–112.
62. Ghosh S.K., Hunter W.B., Park A.L., Gundersen-Rindal D.E. // *PLoS One*. 2017. V. 12. e0171861. doi: 10.1371/journal.pone.0171861.

63. Wang M., Jin H. // *Trends Microbiol.* 2017. V. 25. P. 4–6.
64. Wang M., Yu F., Wu W., Zhang Y., Chang W., Ponnusamy M., Wang K., Li P. // *Int. J. Biol. Sci.* 2017. V. 13. P. 1497–1506.
65. Gaffar F.Y., Koch A. // *Viruses.* 2019. V. 11. E673. doi: 10.3390/v11070673.
66. Cai Q., Qiao L., Wang M., He B., Lin F.M., Palmquist J., Huang S.D., Jin H. // *Science.* 2018. V. 360. № 6393. P. 1126–1129.
67. Wang C., Wu J., Zhu X., Chen J. // *Virus Genes.* 2016. V. 52. P. 823–827.
68. Koch A., Biedenkopf D., Furch A., Weber L., Rossbach O., Abdellatef E., Linicus L., Johannsmeier J., Jelonek L., Goesmann A., et al. // *PLoS Pathog.* 2016. V. 12. e1005901. doi: 10.1371/journal.ppat.1005901.
69. Mitter N., Worrall E.A., Robinson K.E., Li P., Jain R.G., Taochy C., Fletcher S.J., Carroll B.J., Lu G.Q., Xu Z.P. // *Nat. Plants.* 2017. V. 3. 16207. doi: 10.1038/nplants.2016.207.
70. Kanasty R., Dorkin J.R., Vegas A., Anderson D. // *Nat. Mater.* 2013. V. 12. P. 967–977.
71. Zotti M., Dos Santos E.A., Cagliari D., Christiaens O., Taning C.N.T., Smaghe G. // *Pest Manag. Sci.* 2018. V. 74. P. 1239–1250.
72. Mitter N., Worrall E.A., Robinson K.E., Xu Z.P., Carroll B.J. // *Curr. Opin. Virol.* 2017. V. 26. P. 49–55.
73. Bolognesi R., Ramaseshadri P., Anderson J., Bachman P., Clinton W., Flannagan R., Ilagan O., Lawrence C., Levine S., Moar W., et al. // *PLoS One.* 2012. V. 7. e47534. doi: 10.1371/journal.pone.0047534.
74. Li K.L., Wan P.J., Wang W.X., Lai F.X., Fu Q. // *PLoS One.* 2015. V. 10. e0142142. doi: 10.1371/journal.pone.0142142.
75. Zhang X., Mysore K., Flannery E., Michel K., Severson D.W., Zhu K.Y., Duman-Scheel M. // *J. Vis. Exp.* 2015. V. 97. doi: 10.3791/52523.
76. Baum J., Bogaert T., Clinton W., Heck G.R., Feldmann P., Ilagan O., Johnson S., Plaetinck G., Munyikwa T., Pleau M., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2007. V. 25. P. 1322–1326.
77. Konakalla N.C., Kaldis A., Berbati M., Masarapu H., Voloudakis A.E. // *Planta.* 2016. V. 244. P. 961–969.
78. Tian H., Peng H., Yao Q., Chen H., Xie Q., Tang B., Zhang W. // *PLoS One.* 2009. V. 4. e6225. doi: 10.1371/journal.pone.0006225.
79. Gan D., Zhang J., Jiang H., Jiang T., Zhu S., Cheng B. // *Plant Cell Rep.* 2010. V. 29. P. 1261–1268.
80. Yin G., Sun Z., Liu N., Zhang L., Song Y., Zhu C., Wen F. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 84. P. 323–333.
81. Yin G.H., Sun Z.N., Song Y.Z., An H.L., Zhu C.X., Wen F.J. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010. V. 162. P. 1901–1914.
82. Niehl A., Soininen M., Poranen M.M., Heinlein M. // *Plant Biotechnol. J.* 2018. doi: 10.1111/pbi.12904.
83. Zhong C., Smith N.A., Zhang D., Goodfellow S., Zhang R., Shan W., Wang M.B. // *Genes (Basel).* 2019. V. 10. E458. doi: 10.3390/genes10060458.
84. McLoughlin A.G., Wytinck N., Walker P.L., Girard I.J., Rashid K.Y., de Kievit T., Fernando W.G.D., Whyard S., Belmonte M.F. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. 7320. doi: 10.1038/s41598-018-25434-4.
85. Gu K.X., Song X.S., Xiao X.M., Duan X.X., Wang J.X., Duan Y.B., Hou Y.P., Zhou M.G. // *Pestic. Biochem. Physiol.* 2019. V. 153. P. 36–46.
86. Song X.S., Gu K.X., Duan X.X., Xiao X.M., Hou Y.P., Duan Y.B., Wang J.X., Zhou M.G. // *Pestic. Biochem. Physiol.* 2018. V. 150. P. 1–9.
87. Mamta B., Rajam M.V. // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2017. V. 23. P. 487–501.
88. Dubelman S., Fischer J., Zapata F., Huizinga K., Jiang C., Uffman J., Levine S., Carson D. // *PLoS One.* 2014. V. 9. e93155. doi: 10.1371/journal.pone.0093155.
89. San Miguel K., Scott J.G. // *Pest. Manag. Sci.* 2016. V. 72. P. 801–809.
90. Gogoi A., Sarmah N., Kaldis A., Perdakis D., Voloudakis A. // *Planta.* 2017. V. 246. P. 1233–1241.
91. Parker K.M., Barragán Borrero V., van Leeuwen D.M., Lever M.A., Mateescu B., Sander M. // *Environ. Sci. Technol.* 2019. V. 53. P. 3027–3036.
92. Fischer J.R., Zapata F., Dubelman S., Mueller G.M., Uffman J.P., Jiang C., Jensen P.D., Levine S.L. // *Environ. Toxicol. Chem.* 2017. V. 36. P. 727–734.
93. Faustinelli P.C., Power I.L., Arias R.S. // *Plant Biol. (Stuttg).* 2018. V. 20. P. 444–449.
94. Gong L., Chen Y., Hu Z., Hu M. // *PLoS One.* 2013. V. 8. e62990. doi: 10.1371/journal.pone.0062990.
95. Ghosh S.K.B., Hunter W.B., Park A.L., Gundersen-Rindal D.E. // *J. Vis. Exp.* 2018. V. 4. doi: 10.3791/57390.
96. Tenllado F., Martínez-García B., Vargas M., Díaz-Ruiz J.R. // *BMC Biotechnol.* 2003. V. 3. P. 3–10.
97. Jiang L., Ding L., He B., Shen J., Xu Z., Yin M., Zhang X. // *Nanoscale.* 2014. V. 6. P. 9965–9969.
98. Dubrovina A.S., Aleynova O.A., Kalachev A.V., Suprun A.R., Ogneva Z.V., Kiselev K.V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. E1585. doi: 10.3390/ijms20071585.