

УДК 632.938.2:577.29

РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ ОТ ГРИБНОЙ И ООМИЦЕТНОЙ ИНФЕКЦИИ

© 2023 г. И. В. Максимов¹, *, М. Ю. Шеин¹, Г. Ф. Бурханова¹

¹Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимский федеральный исследовательский центр РАН, Уфа, 450054 Россия

*e-mail: igor.mak2011@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.07.2022 г.

После доработки 02.09.2022 г.

Принята к публикации 09.01.2023 г.

Фитопатогенные грибы представляют угрозу продовольственной безопасности, ограничивая биологический потенциал сельскохозяйственных культур и снижая качество получаемой продукции. На современном этапе разрабатываются методы защиты растений, основанные на естественном системном и клеточном фитоиммунитете, где особое место занимает уникальный механизм, описываемый термином “РНК-интерференция” (РНКи). Природный механизм РНКи, обеспечивая регуляцию экспрессии генов-мишеней гомологически зависимым образом с вовлечением белкового комплекса, обозначенного как RISC (RNA-induced silencing complex — РНК-индуцируемый сайленсинговый комплекс), с одной стороны защищает растения от патогенов, но с другой — патогены используют его как фактор вирулентности. Описаны случаи двустороннего обмена малых РНК между растениями и поражающими их грибными патогенами посредством внеклеточных везикул. В обзоре обсуждается роль малых РНК, а также белков DCL, AGO и RdR в ответе растений на инфицирование патогенными грибами и оомицетами и перспективы использования механизма РНКи при создании экологически безопасных, современных препаратов для защитных мероприятий.

Ключевые слова: РНК-интерференция, фитоиммунитет

DOI: 10.31857/S0555109923030133, **EDN:** BEKGHX

РНК-интерференция (РНКи) — одно из выдающихся открытий в биологии, документально подтвержденное в 1998 г. Э. Файром и К. Меллоу на нематодах *Caenorhabditis elegans*, за которое авторы получили Нобелевскую премию [1]. Вместе с тем, сам феномен РНКи наблюдался еще до его официального признания. Например, подобное явление описывалось под термином “квеллинг” (quelling), в качестве объекта наблюдений в 1992 г. использовали гриб *Neurospora crassa* [2], в 1997 г. — *Schizophyllum commune* [3], а в 1998 г. — *Cladosporium fulvum* [4]. А еще раньше, в 1990 г., Р. Йоргенсен наблюдал у трансгенных растений петунии *Petunia hybrid* L. химерные растения с фиолетовыми и белыми, а также полностью белыми цветами, вместо ожидаемого интенсивно фиолетового цвета лепестков за счет гиперэкспрессии гена халконсинтазы [5]. РНКи играет важную роль в эпигенетической модификации, контроле перемещения мобильных элементов, регуляции стабильности генома, экспрессии генов и образовании гетерохроматина, а также в ответных реакциях при воздействии различных стрессовых факторов, в том числе патогенной природы у всех эукариот, включая растения, а также грибы.

Установлено, что в механизме РНКи важную роль играют малые РНК (20–26 н.п.), а также комплекс белков, взаимодействующих с нуклеиновыми кислотами [6]: РНК-зависимая РНК полимераз (RNA-dependent RNA polymerase, **RdR**), Dicer-подобные белки (**DCL**), белки Аргонавты (**AGO**) и белки **RdDM** (РНК-зависимые ДНК-метилазы, RNA-directed DNA metilase) (рис. 1).

Малые РНК. Малые РНК являются ключевыми участниками РНКи. Выявлено их накопление в растениях в ответ на стрессовые факторы среды, включая и биотические, и контролирование экспрессии генов посредством деградации информационной РНК, репрессии трансляции и ремоделирования хроматина [76]. Биогенез многих малых РНК расшифрован и описан [7, 8]. По локализации в геноме их источники классифицируются как “межгенные” и “интронные” [9]. Малые РНК включают в себя два больших класса — микро- (miРНК) и малые интерферирующие РНК (siРНК).

Первая малая РНК, о которой сообщалось, что она вовлечена в процессы иммунитета — miR393, выделена из растений арабидопсиса, обработанных элиситорами, и показан запуск ею супрессии mРНК, кодирующих рецепторы ауксинов, в целях

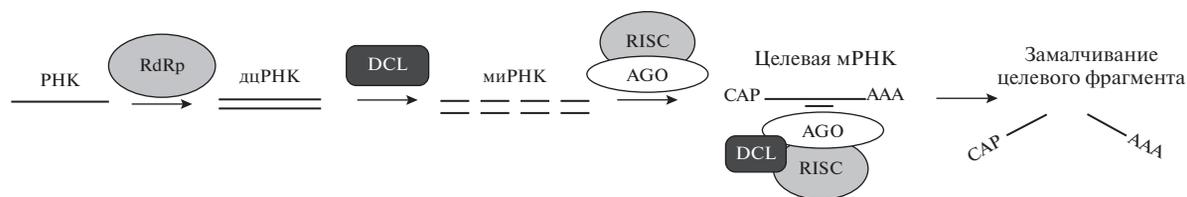


Рис. 1. Схематическое представление механизма РНКи в растениях.

отключения соответствующего сигнального пути и активации запускаемого патогеном иммунитета (pathogen-triggered immunity, **PTI**) [10]. Среди siРНК первой, генерируемой в ответ на инфицирование бактерией *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst), несущей эффектор AvrRpt2, была pat-siR-NAATGB2, регулирующая опосредованный R-генами эффектор-индуцируемый фитоиммунитет (effector-triggered immunity, **ETI**) [11].

Уникальная стратегия защиты растений от патогенов с помощью малых РНК описана в работе Т. Чханг и соавт. [12]. Ими получены малые РНК из мицелия гриба *Verticillium dahliae*, выделенного из зараженного материала хлопчатника, не связанные с геномом патогена, но проявляющие гомологию с последовательностями ДНК из генома хлопчатника (хозяина). Показано, что большая часть малых РНК, экспортированных из растений хлопчатника, действовала на гены вирулентности *Verticillium dahliae*, способствуя, тем самым, развитию устойчивости хозяина к грибу [12].

В геноме пшеницы, инфицированной возбудителем стеблевой ржавчины, описано функционирование локуса, ответственного за продукцию транскрипционно-активных ta-siРНК (ta-siRNA producing locus, **TAS**), не всегда, однако, гомологичного целевым генам [9]. Это предполагает их способность ингибировать экспрессию нескольких генов, например, кодирующих белки, содержащие домены с лейцин-богатым повтором (leucine-rich repeat, **LRR**), такие как трансмембранные рецепторные белки, киназы, α -глиадин, глутатион-S-трансферазу (glutathione S-transferase, **GST**) и десатуразу жирных кислот. Поскольку домен LRR является важным компонентом киназ плазмалеммы, обладающих рецепторными свойствами, можно полагать, что выработка таких ta-siРНК необходима для сигнального “замалчивания” генов, ответственных за гиперчувствительную реакцию в растениях в норме [9].

Выявлено, что мобильные элементы и интроны функционально активных генов могут быть важными источниками малых РНК как в растениях [13], так и в грибах [14]. Так, накопление TE-siR815/osa-miR815 в растениях риса, связанная с интроном WRKY45-1 транскрипционного фактора WRKY45, и зависящая от экспрессии генов *OsRdR2* и *OsDCL3a*, но не *OsDCL1*, *OsDCL2* и *OsDCL3b*, формировала восприимчивость растений риса к патогенной бактерии *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*,

подавляя накопление белка ST1, важного компонента WRKY45-опосредованной устойчивости с помощью белка RdDM [15]. Вместе с тем, в отношении грибка *Magnaporthe oryzae* эта же miРНК работала как позитивный регулятор устойчивости растений [13].

Малые РНК: miR160a, miR396a, miR398b, miR482, miR1444, miR2118, miR6021, miR6022, miR6023 и miR7695 являются немногими примерами miРНК растений, участие которых в регуляции генов защитных белков и в иммунитете против патогенов в целом доказана [16, 17]. Так, если в норме в растениях томата повышенный уровень miR6021, miR6022 и miR6023 подавлял накопление трансмембранного рецепторного белка Cf9, придающего устойчивость к грибу *Cladosporium fulvum*, то при инфицировании такая репрессия гена снималась, что предполагает жесткую супрессию некоторых защитных генов miРНК в условии отсутствия патогенов [10, 17]. Растительные ta-siРНК, направленные против мРНК патогенных эффекторов, названных *Phytophthora Suppressors of RNA silencing* (PSR1 и PSR2) и вырабатываемых в ответ на инфицирование оомицетом, служат межвидовыми защитными молекулами против патогенов. Вероятно, эти ta-siРНК могут экспортироваться из растений-хозяев в мицелий патогена во внеклеточных везикулах, запускать там РНКи против эффекторов PSR1 и PSR2 и снижать вирулентность патогена. Особо следует заметить, что грибной эффектор PSR2, как оказалось, эффективно взаимодействуя с хозяйским белком DRB4 (Double-stranded-RNA-Binding protein 4), вовлеченным в качестве кофактора DCL4 в запуске вторичного биогенеза siРНК, специфически уменьшает накопление вторичных siРНК, регулируемых miR161 и miR173 [18]. В корнях растений сои накопление эффекторов PSR1 и PSR2 усиливало вирулентность оомицета *Phytophthora sojae* [19]. Анализ транскрипционной активности гена, кодирующего эффектор PSR2, показал, что наиболее высокий уровень транскриптов наблюдался в биотрофной фазе патогена, что свидетельствует о необходимости белка PSR2 именно в ранний период формирования взаимоотношений с хозяином. Гомолог PSR2 идентифицирован у *Phytophthora infestans* (PITG_15152) и других видов, вызывающих фитофтороз. В другой работе описан эффектор Pi14054, накапливающийся в пределах 36 ч после начала инфицирования оомицетом *P. infestans*

растений табака *Nicotiana benthamiana* и эффективно подавляющий РНКи хозяина [20]. Кроме того, PSR1 активно влиял как на уровень miРНК, так и на siРНК у *Arabidopsis*, тогда как PSR2 в основном на siРНК [21]. Эффекторный белок PgtSR1, кодируемый двумя аллельными генами (*PgtSR1-a* и *PgtSR1-b*) из гриба *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, подавлял накопление siРНК в растениях, препятствуя защите растений от патогена посредством запуска гиперчувствительной реакции в инфицированных тканях [22]. Патогенная Pst-milR1, выделенная из мицелия *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, обладала свойством транспортироваться в клетки пшеницы, отключать накопление защитного белка PR2 и запускать реакцию восприимчивости к авирулентному изоляту *P. striiformis* f. sp. *tritici* CYR23 [23]. Супрессия накопления пре-Pst-milR1 у вирулентного изолята *P. striiformis* CYR31 способствовала устойчивости растений к болезни [22]. Штамм оомицета *Phytophthora capsica*, не имеющий в своем “арсенале” эффектор PSR2, не снижал в растениях накопление miR161 и связанных с ней вторичных siРНК, экспрессирующихся из локусов TAS1/TAS2, и, соответственно, не приводил к супрессии иммунного ответа [24].

Растения *Solanum tuberosum* L., как гиперпродукующие miR160, так и с подавленным ее уровнем, проявляли восприимчивость к фитофторозу [25], что предполагает строгую регуляторную роль этой малой РНК. Точно также, как регулятор устойчивости растений томатов к фитофторозу, функционирует miR172, имеющая гомологию с участком гена, кодирующего транскрипционный фактор AP2/ERF [26]. В растениях баклажана *Solanum melongena* L. выявлены miR156 и miR395, накапливающиеся при инфицировании грибом *Verticillium dahliae* [27, 28]. Тонко настроенную и многофункциональную роль в РНКи в регуляции устойчивости растений к грибной инфекции выполняют изоформы miR168, выработка которых отключала накопление хозяйского белка VnAGO1 в патогенной системе растений рапса *Brassica napus* с грибом *Verticillium longisporum* и, соответствующим образом, способствовала восприимчивости [29, 30]. В растениях риса *Oryza sativa*, инфицированных грибом *Magnaporthe oryzae*, miR319 проявляла комплементарность к мРНК ключевого фермента синтеза жасмоновой кислоты (ЖК) – липоксигеназы, что подавляло ее синтез и снижало устойчивость растений [31]. В растениях рапса, инфицированных грибом *Sclerotinia sclerotiorum*, показано дифференциальное накопление 68 малых РНК комплементарных генам, кодирующим белки, содержащие нуклеотид-связывающий домен и богатые лейциновыми повторами (NB-LRR), вовлеченные в защитный ответ растений ЕТ1 против различных патогенов [32].

Накопление miR482, как негативного регулятора устойчивости, наблюдали в условиях инфицирования грибными патогенами тополя волосистоплодного *Populus trichocarpa*, сосны ладанной

Pinus taeda, сои культурной *Glycine max*, яблони домашней *Malus domestica*, фасоли обыкновенной *Phaseolus vulgaris* люцерны усеченной *Medicago truncatula*, томатов *Solanum lycopersicum*, картофеля *S. tuberosum*, хлопчатника *Gossypium hirsutum* [33–35]. Обнаружено, что РНКи, опосредованная этой двухцепочечной РНК (дцРНК), имея сродство в растениях к примерно 20% генов, кодирующим NBS-LRR домен [33, 36], может служить настройщиком фитоиммунного ответа, а ее сверхэкспрессия – снижает устойчивость растений к патогенам. В растениях хлопчатника искусственное ингибирование накопления ghr-miR482c, ghr-miR482d.2 и ghr-miR482b/miR482b.2 укрепляло устойчивость к грибу *V. dahliae*. Также, растения томатов после ингибирования накопления sly-miR482f [35] или ее гомолога sly-miR482b [37] повышали устойчивость к *Fusarium oxysporum* или *Botrytis cinerea* соответственно. У томатов, инфицированных грибом *B. cinerea*, показана негативная регуляторная активность pri-miR482b и в отношении маркерных генов, кодирующих защитные белки PDF1.2 и PR4, что предполагает формирование восприимчивости за счет ингибирования ERF-ветви жасмонатного сигнального пути [37]. Универсальность работы miR482 почти во всех семенных, включая и голосеменные, подразумевает относительную эволюционную древность этой группы малых РНК, возникших еще на заре формирования высших растений [36].

Регуляция транскрипции при РНКи может быть опосредована и под влиянием длинных некодирующих РНК, превышающих в длину 200 н.о. и не содержащих значимой открытой рамки считывания (ORF) [38]. Шестьдесят три дифференциально экспрессируемых некодирующих РНК идентифицированы в кукурузе при взаимодействии с микоризными грибами *Rhizophagus irregularis* [38]. У пшеницы межгенные РНК длиной 254 и 52 н.о. экспрессировались на инфицирование грибами *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* и *P. striiformis* f. sp. *tritici* соответственно [39].

Dicer-подобные белки (DCL) – семейство эндорибонуклеаз – РНКазы III, состоящих из геликазы DExD-box-C, домена Piwi-Argonaute-Zwille (PAZ) – домена с неизвестной функции 283 (DUF283), РНКазы III и доменов, связывающих дцРНК (dsRBD). Домен PAZ имеет фосфатсвязывающий карман, состоящий из аргининовых компонентов, распознающих 5'-монофосфат пре-микроРНК и необходимы для ее разрезания на фрагменты коротких дцРНК [40].

Мутанты по генам *Osdcl1* риса и *Atdcl1* арабидопсиса проявляли устойчивость к грибам *Magnaporthe oryzae* и *S. sclerotiorum* соответственно [31, 32], что можно объяснить необходимостью функционирования именно белков DCL1 в формировании miРНК и последующего запуска РНКи, способствующей вирулентности патогенов [41]. Соответственно, отключение выработки белков DCL гриба, снижающее генерацию ими

малых РНК, ожидаемо должно ослабить патогенность и рост грибов в растениях. Действительно, двойные мутанты *dcl1/dcl2* грибов *B. cinerea* [42] и *Colletotrichum gloeosporioides* [43] показали пониженную вирулентность в отношении своих хозяев. У патогенного гриба *Penicillium italicum* вирулентность пропадала при глушении гена *DCL2*, но не *DCL1* (в отличие от *S. sclerotiorum*) [44].

Посттранскрипционное метилирование ДНК. Часто в растениях биотический стресс резко сказывается на профиле метилирования ДНК, что представляет консервативную форму эпигенетической маркировки, связанной с иммунитетом [45]. Метилирование ДНК с участием белков РНК-зависимых ДНК-метилаз (RdDM) имеет два основных этапа: биогенез siРНК и метилирование ДНК, управляемое siРНК. Первая стадия включает РНК-полимеразу (Pol) IV и белки DCL, тогда как вторая стадия включает РНК-полимеразу V, AGO4/6 и РНК-зависимую ДНК-метилазу [46].

У шелковицы *Morus notabilis* устойчивость к грибу *B. cinerea* была увеличена подавлением гена *MnMET1*, что предполагает важность зависимого от РНК метилирования промоторных областей генов защитных белков в формировании эффективной защиты против патогенов [47]. В целом, мутанты *Arabidopsis* с гипометилированием ДНК оказались более устойчивыми к болезням и продемонстрировали повышенный салицилат-зависимый ответ. Мутанты *met1*, *drm1/drm2* и *drm1/drm2/cmt3* (*ddc*), *nrpd1* (мутант по PolIV), *nrpe1* (мутант по PolIV), *nrpd1/nrpe1*, *nrpd2* (субъединица различная у Pol IV и PolV), *drd1* (мутант по DRM), *rdr2*, и *dcl2/3/4* оказались более устойчивыми к бактериальному патогену *Pseudomonas syringae*, а мутанты *cmt3*, *drd1*, и *nrpe1* – к биотрофному оомицету *Hyaloperonospora arabidopsidis* [48]. Напротив, мутанты арабидопсиса *Drd1*, *nrpe1*, *nrpd1/nrpe1* и *nrpd2* проявили восприимчивость к грибу *Plectosphaerella cucumerina* [49], а мутант *ddc* – к *Alternaria brassicicola* [50], что связано с жасмонат-зависимым запуском сигнальной защитной системы. Тройные мутанты по ДНК-деметиلاзам *ros1/dml2/dml3* (*rdd*) демонстрируют повышенную восприимчивость к грибу *F. oxysporum* и, напротив, накопление четырех ДНК-деметилаз DME, ROS1, DML2 и DML3 способствовало устойчивости [51]. Также обнаружено, что промоторы генов *ROS1*, *DML2* и *DML3*, а также транскрибируемые области, кодирующие домены NB-LRR, могут быть деметилированы [52].

В профилях метилирования цитозина пшеницы наблюдали изменения через 96 ч после инокуляции возбудителем листовой ржавчины пшеницы *Puccinia triticina* [53]. У растений *Aegilops tauschii* при заражении грибом *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (Bgt) обнаружено метилирование локусов богатых цитозином [54]. Участие siРНК гриба *Trichoderma atroviride* в эпигенетической регуляции активности генов растений через метилирование их промоторов белками RdDM, сохраняющееся и в

следующем поколении (F1) [55], позволяет использовать такое наследование механизма глушения генов для закрепления в следующем поколении и обеспечивает фундаментальные основы для разработки новых подходов в семеноводстве [56].

Особый интерес представляют данные о влиянии метилирования ДНК, связанной с РНКи, на экспрессию генов, при эндосимбиозе. Так, арбускулярный микоризный гриб *Funneliformis mosseae* индуцировал изменения профиля метилирования ДНК у герани *Geranium robertianum* [57]. В инокулированных и неинокулированных грибным эндофитом SMCD 2206 проростках пшеницы *Triticum turgidum* описаны различные паттерны метилирования ДНК, особенно четко проявившиеся в условиях засухи [58]. Поскольку инокулированные эндофитным штаммом растения оказывались более устойчивыми к засухе, чем неинокулированные, можно полагать, что в растениях микроорганизм запускает ответное усиление чувствительности к стрессовым факторам, близкое по природе к феномену, описываемому термином “прайминг” [59]. Но ответ на вопрос о том, насколько это соответствует действительности и отличается ли в растениях метилирование хозяйских генов в зависимости от уровня трофности микроорганизма, пока еще требует ответа.

Белки аргонавты (AGO) связывают короткие дцРНК, генерированные DCL, и считаются ключевыми в комплексе RISCs. Наиболее важная функция белков AGO – участие в фитоиммунитете. Белки AGO1 формируют совместимость между хозяином и патогеном, что подтверждается в условиях подавления их синтеза укреплением устойчивости растений к грибам *V. dahlia* и *V. longisporum* [30]. Обнаружены различия между белками AGO, связанные с транскрипционным глушением генов (transcription gene silencing, TGS) и посттранскрипционным глушением генов (posttranscription gene silencing, PTGS). Так, белки AGO4, AGO6 и AGO9 важны при TGS, в то время как AGO1, AGO2, AGO3, AGO5, AGO7 и AGO10 при PTGS [60]. Группа белков AGO4 участвует в метилировании ДНК с участием белков RdDM и связывает дцРНК размером 24 п.н, продуцируемые RdR2 и DCL3 [46, 61].

РНК-зависимая РНК-полимераза (RdR) вовлечена в усиление эффекта глушения, реплицируя длинные одноцепочечные РНК (оцРНК) в длинные дцРНК, конвертирующимися в последствии белками DCL до коротких siРНК, что приводит к новому циклу глушения РНК. Белок RdR первоначально был идентифицирован как фермент репликации в РНК содержащих вирусах. Активность растительной RdR, функционально подобной, но генетически не гомологичной вирусной, впервые изучена у китайской капусты в 1971 г. [62]. Оказалось, что эти белки характеризуются функциональным разнообразием. Белки RDR1 участвуют в амплификации экзогенных фрагментов оцРНК

и прайминге фитозащитной системы, а RDR2 – в запуске метилирования ДНК с участием белков RdDM, необходимым в функционировании РНКи и генерации siРНК. RDR6 активирует метилирование ДНК транскрибируемой области в отсутствие RDR2. В селекции на устойчивость роз к листовым пятнистостям оказался эффективен генный локус, содержащий ген *Rdr1* [63].

Передача сигнала РНКи. Известно об огромном числе РНК, перемещающихся по клеткам и тканям растения [33, 64]. У арабидопсиса описано более 3500 фрагментов РНК, способных к перемещению [65]. Присутствие РНК в соке флоэмы ясно демонстрирует, что они мобильны и, таким образом, участвуют в передаче сигналов на большие расстояния. Хорошо изученными мобильными РНК, перемещающимися от одной клетки к другой, являются мРНК, кодирующие фактор транскрипции KNOTTED1, переносчик сахарозы SUC1, а также вовлеченные в синтез miR390 и miR165/166. Наблюдали прохождение мРНК проростка томатов через флоэму и ее выгрузку в клетки привоя, где она транслировалась в ответ на атаку патогенов и придавала устойчивость к ним [31].

В рамках рассмотрения вопроса об участии малых РНК во взаимодействии между хозяином и патогеном необходимо обратить особое внимание на внеклеточные везикулы, вырабатываемые обоими партнерами. Везикулярный обмен РНК между растениями и патогенами описывается как двунаправленная кросс-межцарственная РНКи, что в условиях инфицирования может способствовать как иммуностимулирующим, так и иммуносупрессивным процессам [8]. Внеклеточные везикулы описаны у различных штаммов грибов, и они выполняют функции доставки факторов вирулентности, ремоделирования клеточной стенки и взаимодействия между патогеном и хозяином [66]. Точно также растения *A. thaliana* секретируют во внеклеточную среду TAS1c-siR483 и TAS2-siR45 в составе везикулярных пузырьков, направляющихся в места инфицирования, поглощающиеся клетками гриба *B. cinerea* и, подавляя экспрессию мРНК Vc-Vps51, Vc-DCTN1 и Vc-SAC1, снижают вирулентность гриба [64]. Подобный механизм глушения патогенных генов обнаружен у подсолнечника, томатов и оливы, что указывает на то, что точный межцарственный транспорт растительной дцРНК опосредуется внеклеточными везикулами [65]. Растения хлопчатника индуцируют биогенез двух специфических miR166 и miR159 при заражении возбудителем вертициллеза *Verticillium dahliae* и экспортируют их в клетки мицелия гриба для подавления работы генов Ca²⁺-зависимой цистеиновой протеазы (Clp-1) и гидроксилазы изотриходермина C-15 (HiC-15), связанных с вирулентностью, и обеспечивают таким образом устойчивость к болезням [68]. Особо следует отметить, что секреция во внеклеточную среду малых РНК в экзосомах не только усиливается во

время стрессового воздействия, но и способствует укреплению врожденного фитоиммунитета [69]. Так, транспорт малых РНК из клеток хозяина в мицелий патогена наблюдали в системе пшеница – гриб *Fusarium graminearum*, где хозяйская miR1023 подавляла инвазию гриба, глуша ген *FgSG_03101*, кодирующий альфа/бета-гидролазы [70]. И напротив, используя экзосомы, гриб *B. cinerea* доставлял свои белки-эффекторы в клетки-хозяина и снижал эффективность работы хозяйского механизма РНКи [71]. О возможности отключения фитоиммунитета через механизм кросс-межцарственной РНКи говорят факты обнаружения в растениях томата, инфицированных грибом *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, Fol-miR1, генерируемой им и комплементарной к фрагменту растительного гена *Solyc06g007430*, кодирующего протеинкиназу SlyFRG4 [72]. Для эффективного отключения трансляции мРНК *Solyc06g007430* оказалась необходима загрузка Fol-miR1 в комплекс RISC, содержащий белок SlyAGO4a, а отключение накопления этого белка методом VIGS приводило к пониженной восприимчивости к грибу [72].

Исходя из возможности дцРНК транспортироваться по растению, можно полагать, что эффективная доставка дцРНК к месту локализации патогена имеет решающее значение для контроля инфицирования патогенами и наоборот [73]. Показан перенос ряда малых РНК из клеток арабидопсиса в клетки гриба *B. cinerea* через внеклеточные везикулы, подавляя гены вирулентности грибов и способствуя повышению иммунитета хозяина [74]. Выдвигается предположение, что экзосомы защищают малые РНК от атаки нуклеаз в апопласте, что объясняет их стабильность и активность после переноса и существование опосредованного экзосомами обмена дцРНК в патогенной системе [75]. Взятые вместе, комбинация трех возможных транспортных систем для РНК (плазмодесмы, экзосомы и сосудистая транспортная система) позволяет распределять дцРНК по всему организму и даже за его пределами. В растениях секреция везикул происходит не только при инфицировании, но и при абиотических стрессовых воздействиях, фитогормональном воздействии, предполагая врожденный характер работы РНКи на внешние воздействия [76].

Супрессия хозяйской (растительной или грибной) РНКи. Необходимо помнить, что РНКи – продукт совместного эволюционного развития хозяина и его паразитов [64]. Понятно, что, поскольку генная организация, клеточные структуры и многие метаболические пути грибной клетки аналогичны таковым других высших эукариот, эта группа организмов может также использовать РНКи для своей защиты от других патогенов. Но понятно и то, что такой механизм эффективной РНКи может функционировать и для преодоления патогенами защиты хозяина [77]. О важной противодействующей роли компонентов (белков), включенных в РНКи как растения, так и патогенного гриба опи-

сано в обзорной работе Лакс с соавт [78]. Данное противодействие – пример сложной и интенсивной “эволюционной борьбы” между вирусами, фитопатогенами и фитофагами с одной стороны и растениями с другой. Коэволюция между супрессорами и РНКи также свидетельствует о чрезвычайно сложной природе адаптации мутуалистов, симбиотрофов и патогенов к фитозащитной системе.

В геноме грибов идентифицированы гены, кодирующие гомологи белков RdR, AGO и DCL [79], а продукты этих генов обладали аналогичными функциями защитной активности против биотической инфекции, как у всех высших эукариот [80]. У патогенного гриба *Verticillium nonalfalfae* идентифицированы по 2 белка для всех трех ключевых компонентов РНКи (AGO, DCL, RdR), а также выстроено их филогенетическое древо [81]. Были подтверждены существующие таксономические отношения в группе грибов *Ascomycetes*, а также высокое сходство аминокислотных последовательностей генов, вовлеченных в РНКи, между представителями *Hypocreomycetidae* и *Sordariomycetes*.

Грибы имеют активные пути РНКи, влияющие на их патогенность. Гриб *F. graminearum*, возбудитель фузариоза пшеницы, кодирует два белка DCL, два белка AGO и пять белков RdR [82]. Мутанты, лишенные одного или двух генов РНКи у этих видов, обычно теряют способность проникать через листья [43]. Так, вирулентность *F. graminearum* на листьях ячменя зависела от активности грибных белков DCL, ответственных за генерацию патогенных дцРНК, интерферирующих экспрессию ряда генов хозяина, таких как *HvEOL1*, *HvBAK1*, *HvSERK2* и *BdSERK2*, связанных с регуляцией этилен-жасмонатной сигнальной системы [83]. Аналогичный эффект наблюдался и у гриба *S. sclerotiorum*: мутанты по генам *AGO2* [84] и двойные мутанты по гену *DCL 2/4* [85] имели замедленный рост и пониженную вирулентность. Подавление уровня транскриптов гена *AGO2* также снижало вирулентность у грибов *Valsa mali* и *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* [86]. Хотя единичные нарушения в работе генов *DCL*, *RdR* гриба *Colletotrichum higginsianum* не влияли на вегетативный рост гриба, двойные мутанты $\Delta dcl1$, $\Delta dcl1\Delta dcl2$ и мутанты $\Delta ago1$ демонстрировали серьезные дефекты в морфологии конидий [87]. Гриб *V. dahliae* также использует малые РНК в качестве эффекторов, встраивая их в хозяйский белковый комплекс RICS, содержащий белки AGO1, арабидопсиса для подавления его (растительных) генов. Обнаружена способность ряда малых РНК гриба *B. cinerea* (Vc-sRNAs) подавлять накопление транскриптов ряда генов арабидопсиса и томатов, отвечающих за работу РНКи (AGO1) и иммунитета [42]. А двойное отключение работы генов и *Bcdcl1*, и *Bcdcl2*, вызывающее неспособность мутантов продуцировать Vc-siRNAs, подавляло его патогенность [42].

При анализе сортов хмеля *Humulus lupulus* L., контрастных по устойчивости к грибу *Verticillium nonalfalfae*, обнаружено дифференциальное накопление транскриптов грибных генов, ответственных за РНКи, в зависимости от локализации в различных органах растения, а с использованием методов высокопроизводительного секвенирования и обширного биоинформационного анализа идентифицировали до 156 предшественников малых РНК [88].

Обнаружено, что мРНК, транскрибируемые *Phitophthora sojae* и способствующие трансляции патогенных эффекторов РНК (PSR1 и PSR2), нацелены на РНКи хозяина. PSR1 ингибирует биогенез miРНК, тогда как PSR2 нацелен исключительно на siРНК [21]. Аналогичным образом, *B. cinerea* продуцирует малые РНК (Vc-siRNAs) во время инфекции, чтобы вызвать у томата и арабидопсиса “замалчивание” генов, кодирующих митоген-активируемую протеинкиназу-1 (mitogen-activated protein kinase 1 – MPK1) и MPK2, пероксиредоксин (peroxiredoxin-2F – PRXIIIF) и киназу, связанную с клеточной стенкой (cell wall-associated kinase – WAK). У томата Vc-siRNAs подавляли накопление MAPKKK4 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4), напрямую влияющую на устойчивость к грибу *B. cinerea* [42]. Аналогичным образом возбудитель ржавчины пшеницы *P. striiformis* f. sp. *tritici* (Pst) продуцирует miРНК-подобную РНК 1 (Pst-milR1), которая подавляет защиту пшеницы во время ее взаимодействия с инфекционными структурами гриба. “Замалчивание” предшественника Pst-milR1 повышало устойчивость пшеницы к инфекции Pst [23]. Анализ miРНК в растениях пшеницы, инфицированной грибом *Puccinia striiformis*, показал, что большая их доля, синтезируемая в патогенной системе, направлена против генов, ответственных за экспрессию растительных белков, имеющих функциональные домены RabGAP/TBC, “цинковые пальцы”, цистеин-богатой рецептор-подобной протеинкиназы [89]. Выдвигается предположение, что эти miРНК вовлечены в межгенные взаимодействия между хозяином и патогеном [89]. Кроме того, в транскриптом, вырабатываемом возбудителями мучнистой росы злаков *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*) и *B. graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*), данные последовательности РНК, полученные из инфицированной пшеницы, выявили шесть малых РНК от *Bgt* и пятнадцать малых РНК от *Bgh*. Последовательности их нуклеотидов были комплементарны большому числу растительных генов, что указывает на их многофункциональность. Большая часть таких генов кодирует белки, включенные в процессы транспорта ацил-КоА, биосинтеза убихинона, прорастания семян и макромолекулярный катаболизм. Эти грибные малые РНК предсказали мишени, присутствующие исключительно в растениях, с функциями, связанными с изменениями первичного метаболизма [95]. Это доказало наличие транспорта РНК между представите-

лями разных царств живого мира [95]. Эффективность переноса малых РНК от растений в мицелий патогенных грибов и последующий запуск РНКи доказан с использованием модифицированных грибов *M. oryzae*, *Venturia inaequalis*, *Ph. infestans*, *Histoplasma capsulatum* и *Blastomyces dermatitidis*, содержащих ген зеленого флуоресцирующего белка (GFP), а также растений, генерирующих антиGFP малых РНК [90]. Наконец, у биотрофного оомицета *Hyaloperonospora arabidopsidis* обнаружено до 34 малых РНК, способных к транслокации в клетках и подавлению хозяйских генов-мишеней. При этом арабидопсис, мутантный по биогенезу малых РНК, был восприимчив к грибу *H. arabidopsidis*, демонстрируя тем самым их важную роль в иммунитете растений [91]. Группа Х. Джина показала, что некротроф *B. cinerea* продуцирует малые РНК во время инфекции, отключающие гены РНКи хозяина [42]. Следовательно, взаимодействие хозяина с патогеном постоянно развивается и РНКи стала эволюционно приобретенным преимуществом не только для растений, но и для патогенов. Между фитоиммунным ответом и развитием инфекции патогена сохраняется баланс, обусловленный работой РНКи [78].

Другие участники растительного метабиома, вирусы или эндосимбионты, могут вовлекаться во взаимное воздействие на работу РНКи [92]. Так, показано, что колонизация корней орхидей эндозитным грибом *Piriformospora indica* усилила накопление в листьях мРНК, кодирующей белки, содержащие домен NBS-LRR, снижая уровень miR524650, miR1510a*, miR2118 и miR5246, направленных против транскриптов этих белков, и обеспечила лучшую устойчивость растений к бактериальной гнили, вызываемой *Erwinia chrysanthemi* [93]. Особый интерес в связи с отмеченной выше коррекцией грибом *Piriformospora indica* эффективного функционирования фитоиммунитета представляет то, как малые РНК могут регулировать симбиотические взаимоотношения между растением и микоризными грибами, поскольку они, также, как и все представители царства грибов, обладают всеми необходимыми компонентами РНКи [94]. Во время установления симбиоза большинство малых РНК эндосимбионтов нацелена на систему защиты растений. Например, при формировании симбиотических отношений эктомикоризного гриба *Pisolithus microcarpus* с корнями эвкалипта *Eucalyptus grandis* экспрессируется Pmic_miR-8, которая, как показывают авторы, в последствии, обнаруживается в клетках хозяина [95]. Сравнение нуклеотидных последовательностей Pmic_miR-8 с комплементарными в геноме арабидопсиса последовательностями ДНК показало, что она может узнавать гены, кодирующие семейство ДНК-нуклеаз K00246 и L01882, а также фрагмент домена NB-ARC гена, кодирующего защитный ген E03170. Показано регулируемое эндозитными грибами *Trichoderma atroviride* и *T. cretense* изменение уровня транскриптов

miR398, miR167 и miR159 в растениях пшеницы в ответ на инфицирование продуцирующим микотоксины грибом *Fusarium culmorum*, что способствует защите от патогена [16]. Обнаружено активное участие малых РНК в регуляции взаимоотношений арбускулярных микоризных грибов с люцерной *Medicago truncatula* [96], томатами *Solanum lycopersicum* [97] и рисом *Oryza sativa* [98]. При этом большинство индуцированных miРНК были нацелены на гены, ответственные за гормональный ответ. Например, miРНК E4D3Z3Y01BW0TQ нарушала функционирование сигнального пути гибберелловой кислоты [99].

Известно, что у грибов РНКи способна активироваться посредством либо процесса “подавления”, либо за счет биогенеза siРНК, в зависимости от вида гриба, стадии развития, а также от типа целевой последовательности. У гриба *Neurospora crassa* подтверждено наличие нескольких путей “замалчивания” генов [100]. Ряд связанных с подавлением процесса квеллинга (qde) исследований на мутантах *N. crassa* указывает на присутствие малых РНК в механизме подавления, а также на деффектность мутантов qde-1 по RdR. Кодированные RdR гены *SDE1/SGS2 Arabidopsis thaliana* и *EGO-1* у *Caenorhabditis elegans* оказались необходимы для пост-транскрипционного глушения генов (*PTGS*) и РНКи, соответственно. Ген *qde-2*, кодирующий белковый продукт с доменом piwi-PAZ (PPD или AGO), важный и консервативный компонент РНКи в различных эукариотах [100].

Некоторые компоненты РНКи могут отсутствовать у ряда видов грибов, например, из таксонов *Ustilaginomycotina*, *Saccharomycotina*, *Wallemiomycetes* и клады *Microsporidia*, что указывает на необязательность РНКи для них и, вероятно, их способность обходиться без этого физиологического механизма, а в случае с патогенными формами — использовать хозяйскую систему “замалчивания” генов в своих целях [101]. У биотрофа *Erysiphe necator* отсутствуют белки RdR и ДНК-метилаза [91]. Возбудитель головни кукурузы *Ustilago maydis* утратил гены, кодирующие основные компоненты РНКи. В то время как родственные ему виды, такие как возбудитель головни ячменя *Ustilago hordei*, имеют функционально эффективную РНКи [102]. М. Дебишир с соавт. [14], изучая малые РНК гриба *S. sclerotiorum*, отмечают, что почти все идентифицированные локусы, отвечающие за их генерацию, были связаны с ретро-транспозонами, в особенности с LINE1 (до 40%). Они находились вне кодируемой области генома, при этом область, включающая эти локусы, оказалась более полиморфной, что говорит о быстро эволюционирующей совокупности малых РНК-эффекторов, связанных с мобильными элементами генома. Высказывается мнение, что случайное действие малых РНК патогена на иммунитет хозяина дает патогену селективное преимущество [103]. С другой стороны, потеря компонентов, отвечающих за РНКи у грибов, вероятно, связана с

эволюцией вирулентности, так как свободное движение ретротранспозонов (отсутствие контроля за движением мобильных элементов) может обеспечивать быстрые адаптационные ответы на стрессовые воздействия среды [78].

Еще одно интересное явление — это синтез рядом видов патогенных грибов малых РНК, получивших название miРНК (microRNA-like RNA — miРНК-подобная РНК) [42]. Например, miR1 представлена только у *Puccinia striiformis* Westend, а у других возбудителей ржавчины *Puccinia graminis* Persoon и *P. triticea* Erikss. она отсутствует. Соответственно, образование MILR1 только у одного вида может быть результатом его эволюции и адаптации к паразитированию на строго определенном виде [82]. Данная miРНК участвовала в “межродовой” РНКи, воздействуя на экспрессию гена *PR2* (β -1,3-глюканаза) в пшенице. Ее высокий уровень, снижая экспрессию гена *PR2*, усиливал чувствительность пшеницы к ранее авирулентному штамму патогена, тогда как ингибирование накопления предшественника miРНК укрепляло устойчивость пшеницы к вирулентному штамму *P. striiformis* [23].

Фитогормоны и РНКи. В функционировании РНКи в растениях важное место занимают фитогормоны. Так как салициловая кислота (СК) — один из ключевых факторов, ответственных за индукцию системной приобретенной устойчивости (СПУ) к биотрофам интерес представляет ее способность участвовать в работе РНКи. Координированная работа белков, вовлеченных в СПУ, с белками РНКи, пока не полностью расшифрована. Основные участники РНКи, такие как эндонуклеазы DCL2, DCL3 или DCL4, как оказалось, не связаны с СПУ, индуцированной СК или ее функциональными аналогами [104], тогда как накопление транскриптов гена *RdR1* происходило под влиянием СК и зависело от экспрессии белка NPR1 [105]. Соответственно, СК-индуцированная устойчивость связана с РНКи через ген *RdR1* и координируется его продуктом. В свою очередь, экспрессия гена *RdR1* усиливала экспрессию генов, кодирующих *RdR6* (компонент РНКи) и альтернативную оксидазу (про-/антиоксидантная система). Такая координация по всей видимости является гибкой, поскольку у *A. thaliana*, накапливающих вирусный эффекторный белок 2b, экспрессия гена *AGO2* становилась салицилат чувствительной [65]. Буквально недавно обнаружено, что СК и miR403a, комплементарная фрагменту гена *NbAGO2*, эффективно регулировали экспрессию гена *NbAGO2* у табака *Nicotiana benthamiana* [106]. Уровень транскриптов гена *AtRdR1* выше у *A. thaliana*, предварительно обработанной СК, тогда как ген *AtRdR2* не чувствителен к ней [104]. Ген *StRdR1* *S. tuberosum* показал высокую чувствительность к СК [107]. У перца *Capsicum annuum* L. экспрессия гена *CaRdR1* стимулировалась под влиянием СК, абсцизовой кислоты (АБК), пероксида водорода (H₂O₂) [108]. Анализ *in silico* промоторной части

генов семейства *RdR1-6* различных видов растений показал, что основными их транскрипционными факторами являются белки MYB44, AS1/AS2 и WRKY1 [109]. Подавление экспрессии *NaRdR1*, *NaRdR2*, но не *NaRdR3* повышала восприимчивость табака *Nicotiana attenuata* к грибу *Fusarium brachygibbosum* [110].

Важную роль в СК регулируемой устойчивости играют miR160. Так, линии картофеля с подавленной экспрессией miR160 не запускали СПУ, регулирующую СК. В связи с тем, что сигнальные системы, регулируемые СК и ауксинами, проявляют противоположную направленность, можно полагать, что miR160 вовлечена в их перекрестное взаимодействие [25]. Показана важность TAG-производной 21-nt siРНК, опосредовано индуцированной СК в метилировании ДНК у арабидопсиса [111].

Участие АБК в защите растений от грибной инфекции ранее обсуждалось [112]. Этот фитогормон, являясь регулятором ответных реакций на, как правило, абиотический стресс, вовлекается и в фитоиммунные процессы, препятствуя колонизации патогенов в растительных тканях посредством регуляции работы устьиц, экспрессии генов про-/антиоксидантной системы, а также синтеза каллозы. Наконец, обнаружена важная роль АБК в регуляции работы РНКи и соответственно формировании фитоиммунитета [113]. У *A. thaliana*, гиперсинтезирующей АБК, индуцируется накопление транскриптов генов *AtAGO4* и *AtAGO10*. Хотя в физиологических реакциях СК и АБК часто обсуждаются с позиции антагонистов, они могут совместно модулировать различные защитные ответы, в том числе и РНКи, на уровне регуляции экспрессии генов, кодирующих транскрипционные факторы (транс-факторы), а также основные белки РНКи. Поскольку только в мутантных по уровню СК растениях АБК вызывала экспрессию генов *AGO1* и *RdR1*, вероятно этот фитогормон запускает экспрессию генов каскада сигналов салицилат-зависимой экспрессии, а СК регулирует интенсивность накопления защитного продукта [46]. Выявлено, что растения с высоким уровнем синтеза AGO1 слабо чувствительны к АБК и, наоборот, при нарушении синтеза AGO1, формируют гиперчувствительность к АБК.

Жасмонаты индуцируют в растениях устойчивость к некротрофам. В отношении биотрофных и гембиотрофных патогенов их роль противоречива. У табака в формировании устойчивости по жасмонатному сигнальному пути к грибу *F. brachygibbosum* оказалось критичным наличие белка NaAGO4 [110]. Показано, что активация бактериями *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 устойчивости *A. thaliana* по жасмонатному сигнальному пути находится под контролем miR846. Белок AGO4 оказался важным в формировании защиты у *N. attenuata* к грибу *Fusarium brachygibbosum*, а “замалчивание” его синтеза нарушало работу жасмонатной сигнальной системы [110]. Такое нарушение происходило вслед-

ствии отключения синтеза ЖК, а устойчивость к грибу восстанавливалась после обработки растений ЖК. Таким образом, полученные данные дополнительно объясняют, как защитные сигнальные системы и РНКи могут совместно работать в растениях.

Для более полной оценки важности молекулярных взаимоотношений между защитной системой организма и патогена необходимы дальнейшие детальные молекулярные, биохимические и структурные исследования супрессоров патогенной природы. Но уже известные данные говорят о сложной коэволюционной “гонке вооружений” между хозяевами и их патогенами. Со временем эти знания могут быть реализованы для развития эффективных стратегий фитозащиты.

Прикладной аспект. Фундаментальная защитная роль РНКи в растениях, в первую очередь, проявляется в формировании уникальной естественной защитной стратегии организма и описывается как хозяин-индуцированный генный сайленсинг (ХИГС, host-induced gene silencing, HIGS), эффективно работающий не только против вирусов, но и фитопатогенных грибов и оомицетов [64]. На современном этапе исследований описано формирование ХИГС с вовлечением хозяйских белков, отвечающих за РНКи, на пшенице и ячмене, инфицированных возбудителем мучнистой росы биотрофом *Blumeria graminis* [9], на пшенице – возбудителем ржавчины *Puccinia tritici* [114], на пшенице и банане, инфицированных грибами рода *Fusarium* [12], картофеля и перце, инокулированных возбудителями фитофтороза *P. infestans* [115] и *P. capsica* [116], соответственно, а также на томате и арабидопсисе, инфицированных возбудителем вертициллеза [117].

Природный ХИГС предполагает возможность искусственной модификации генома хозяина с помощью внедрения в него последовательности, отвечающей за транскрипцию шпилечной дцРНК, содержащей информацию о целевом гене патогена, который в последствии планируется заглушить. Идеи о возможности терапевтического использования РНКи для эффективного подавления экспрессии генов в организмах появились уже вскоре после его открытия [118]. В ранних работах РНКи в основном использовалась для повышения устойчивости растений к болезням путем внедрения в геном транскрибируемых фрагментов ДНК, содержащих палиндромные последовательности генов эффекторов. Так, в обзорной работе Sang H. и Kim J. [119] приводится не менее 11 вариантов эффективных технологий фитозащиты с использованием методов РНКи.

Искусственные дцРНК, генерируемые растениями, способны индуцировать “замалчивание” генов у грибов, нематод, насекомых и оомицетов, что указывает на их успешный перенос от хозяина в клетки патогенов [71]. РНК-структуры, содержащие гомологии к генам синтазы хитина, важного

компонента клеточной стенки грибов, внедренные в геном растений, обеспечивали их защиту от гриба *S. sclerotiorum* [72]. Пшеница, накапливающая дцРНК против патогенных генов, кодирующих хитин-синтазы (Chs3b) или β -1, 3-глюкансинтазы [83], может вызывать серьезные дефекты в формировании клеточных стенок гифов *Fusarium graminearum* и *Fusarium culmorum* соответственно и демонстрируют повышенную устойчивость к этим патогенам. Экспрессия трех конструкций РНК в двух различных сортах пшеницы трансгенных по *FgCYP 51* (гены биосинтеза эргостерола) и *FgChs3b* (ген хитин-синтазы) обеспечила высокую устойчивость культуры к фузариозу колоса и ограничила развитие гриба [120]. С использованием специфических векторов, содержащих сенс- и антисенс-фрагменты гена, кодирующего MAP-киназу 1 (Pathogenicity MAP Kinase 1, РМК1) *Rhizoctonia solani*, получены растения риса, показавшие снижение степени поражения грибом по технологии ХИГС [121]. Экспрессия дцРНК, комплементарной мРНК MAP-киназы (PtMAPK1, 520 нп) или циклофилина (PtCYC1, 501 нп), возбудителя ржавчины *Puccinia triticea* в пшенице показала эффективное глушение соответствующих генов и значительное последующее за глушением генов снижение патогенности грибов. Пролиферация клеток мицелия *P. triticea* была снижена вместе с уменьшением числа транскриптов генов-мишеней грибов в устойчивых растениях на основе РНКи [122].

Супрессия факторов вирулентности (Ave1, Sge1 и NLP1) гриба *V. dahliae* посредством ХИГС снижала восприимчивость арабидопсиса и томатов к вертициллезу [6]. Растения томатов, генерирующие фрагменты генов PEX6, кодирующих белок фактора биогенеза пероксиосом 6, принадлежащий к семейству белков АТФазы (FoPEX6-RNAi) и β -1,3-глюкозилтрансферазы (FoGAS1-RNAi) гриба *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), важных в биогенезе клеточной стенки и морфогенезе мицелия, проявили устойчивость к этому грибу [123].

В качестве эффективного метода искусственного запуска целевого РНКи предлагается и транспластомная модификация растений, когда дцРНК продуцируются в пластидах, где уровень экспрессии дцРНК может достигать 0.4% от общего уровня РНК [124].

Глушение генов 1,3- β -глюканозилтрансферазы (*BgGTF1* и *BgGTF2*) с помощью технологии вирус индуцированного генного сайленсинга (ВИГС) на базе вируса мозаики ячменя (BSMV) значительно замедлило рост гриба *P. striiformis* f. sp. *tritici* [125]. Ячмень, накапливающий дцРНК, нацеленную на ген авирулентности *Avra10*, соответствующий гену устойчивости *Mla10*, показал снижение уровня транскриптов генов возбудителя мучнистой росы *B. graminis* [126]. Лocus устойчивости к милдью (*Mlo*) кодирует трансмембранный белок, действующий как отрицательный регулятор фитоим-

мунитета в неинфицированных тканях, участвует в защите от гибели клеток, а также в ответах на биотические и абиотические стрессы [127]. Подавление экспрессии гена *TaMlo* пшеницы через ВИГС формировало устойчивость пшеницы к мучнистой росе [128]. В другой работе одновременный нокаут у пшеницы трех гомеологических генов *TaMlo* с использованием технологии геномного редактирования TALEN (transcription activator-like effector nuclease) и мутации в аллеле *TaMLO-A1*, используя комплексную технологию CRISPR-Cas9 и РНКи, также формировало устойчивость [129].

Нацеливание на гены метаболизма жирных кислот у патогена с помощью РНКи оказалось важной стратегией для создания устойчивости к грибковым болезням. РНКи-опосредованное подавление гена риса *OsSSI2* привело к повышенной устойчивости к *Magnaporthe grisea*. Кроме того, она могла быть достигнута подавлением генов *OsFAD7* и *OsFAD8*, представляющих десатуразу жирных кислот [130]. Показано, что в пшенице 24 вида miРНК участвуют в ответах на атаку *B. graminis* f. sp. *tritici* [131]. Малые РНК *Osa-miR7695* и *Osa-miR7696* противоположно регулировали накопление ассоциированного с иммунитетом белка *OsNramp6* в ответ на инфицирование *M. oryzae* в растениях риса [132].

С использованием метода РНКи доказана важность рецепции в растениях патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП), в частности хитина, в дальнейшем развитии оксидативного взрыва в зоне инфицирования. Сайленсинг гена *SEViP*, ответственного за связывание хитоолигосахаридов, в растениях *Oryza sativa* с помощью технологии ХИГС ингибировал образование активных форм кислорода и экспрессию генов, участвующих в иммунном ответе [133]. С использованием антисенс-конструкций к генам *FUM1* и *FUM8* фузинозин-продуцирующих штаммов *Fusarium verticillioides* на кукурузе позволили многократно снизить концентрацию токсина [134].

Возможность запускать механизм РНКи посредством экзогенного применения целевой дцРНК в качестве спрея с целью нарушения экспрессии жизненно важных генов вредителей и патогенов открывает новые возможности в развитии современных экологически чистых технологий и стратегий защиты растений, не связанных с растительным трансгенозом и созданием генно-модифицированных растений. Это направление фитозащиты развивается очень быстро и описывается термином “индукция замолкания генов с помощью опрыскивания” или спрей индуцированного генного сайленсинга (СИГС, spray induced gene silencing, SIGS). Суть этой технологии заключается в распылении препарата, содержащего целевую дцРНК, по поверхности, например, листа растений [135]. Уникальность этого метода сочетается также с тем, что с одной стороны сами дцРНК, а также их носители могут характеризоваться

своими свойствами ПАМП и запускать защиту растительной клетки, связанную с классическими сигнальными системами защиты РТИ и ЕТИ, опосредованными активацией рецепторных киназ SERK (Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase) и MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases), взаимодействующих с РНКи. С другой стороны, дцРНК могут проникать в ткани растения, амплифицироваться в клетках, перерабатываться в siРНК, как правило 22 нт, и индуцировать природные механизмы РНКи и запустить замолкание целевых генов вредителя или патогена после аппликаций препаратами дцРНК поверхности тканей.

Использование дцРНК в виде спрея имеет множество преимуществ перед химическими препаратами. В связи с высокой комплементарностью дцРНК к определенному фрагменту целевого гена, продукт которого отвечает за вирулентность или жизненно-важные функции патогена, препараты на их основе могут действовать специфически и есть возможность использования в одном препарате нескольких форм дцРНК, направленных на различные области гена или даже на разные гены целевого организма. Такая схема принципиально отличается от использования генетической модификации самих растений, но требует разработки методов доставки “РНКи-пестицида”, в том числе и “РНКи-фунгицида”, защиты РНК-молекул от солнечного света, смыва дождем. При создании препаратов на основе РНКи необходимо помнить и о том, что регуляция замалчивания защитных генов в растениях, заселенных вредителями, может быть связана и с эндосимбионтным микробиомом, а также виромом, которые могут регулировать РНКи в растительном метабиоме (рис. 2).

Стратегия СИГС считается экологически чистой и впервые применена в работе Коч с соавт. [135], где, используя дцРНК, нацеленную на ген цитохрома P450 (*CYP3*) в *F. graminearum*, наблюдали подавление роста патогена в непосредственно опрысканных этой РНК листьях пшеницы. В другой работе эта же группа исследователей усовершенствовала метод, что позволило избавиться ячмень от корневой гнили [136]. Сравнение методов ХИГС и СИГС на модельных растениях арабидопсиса и ячменя показало проявление большей эффективности в защите от колонизации грибом последней [137]. Хотя технология СИГС активно изучается [138], исследования по ее использованию все еще находятся на стадии накопления материала. При этом можно полагать, что внешнее воздействие может не только непосредственно подавлять функционирование генов патогена, но и воздействовать на функцию хозяйского генома.

Так, сообщалось об успешном применении метода СИГС с использованием видоспецифических дцРНК на рапсе (*Brassica napus*) для защиты от *B. cinerea* и *S. sclerotiorum* [139]. При внесении

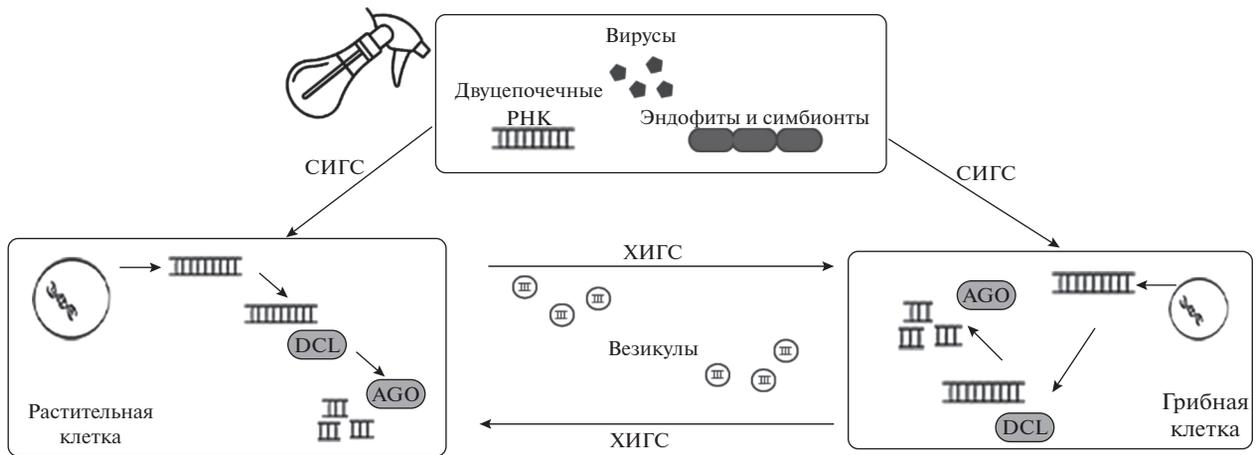


Рис. 2. Схематическое представление работы механизма РНК-интерференции в патогенной системе растение – гриб и возможность ее коррекции.

дцРНК, комплементарной гену *CYP51*, в жидкую культуру *F. graminearum* наблюдали слабый рост гриба и изменение его морфологии. Создание линий *A. thaliana* и ячменя, экспрессирующих дцРНК, привело к значительному повышению их устойчивости. Рост мицелия был ограничен в местах инокуляции патогена, а инокулированные зерновки ячменя практически свободны от инфекционных структур. Обработка *in vitro* спорами *F. graminearum* дцРНК длиной 791 п.н, нацеленной на ген *FgCYP51* (ген биосинтеза эргостерола – цитохром Р450 ланостерол С-14 α -деметилазы), в культуре, а также *in vivo* на ячмене подавляла рост грибов как в областях, где распылялась дцРНК, так и в дистальных частях листьев [135]. В листьях томатов, клубники, винограда, салата, лука, розы и арабидопсиса подавление экспрессии грибного гена *BcDCL1-2* гриба *B. cinerea* с использованием целевых дцРНК и технологии СИГС значительно снижало развитие серой гнили [139]. Этот подход открыл новые возможности в развитии экотехнологий для улучшения растений за счет подавления специфических генов, продукты которых сопровождают или даже усугубляют развитие стрессового фактора. В этой связи наиболее перспективным является экзогенная доставка компонентов РНКи, исключая необходимость в модификации генома сельскохозяйственных культур, и который может быть использован против практически любого патогена и вредителя, реагирующего на подходы РНКи [71].

Отмечены положительные эффекты экзогенного использования молекул РНК против фитопатогенных грибов аскомицетов [138]. СИГС с использованием дцРНК, нацеленных на гены *FgAGO* и *FgDCL* гриба *F. graminearum*, способствовал защите листьев ячменя от инфекции [140]. Аналогично, вирулентность *F. asiaticum* снизилась после распыления на колеоптили пшеницы дцРНК, нацеленной на ген миозина 5 [140]. В этом случае

молекулы дцРНК, комплементарные нескольким регионам целевого гена, оказывали непосредственное влияние на рост мицелия, жизнедеятельность и вирулентность гриба. В связи с неспособностью гриба *F. asiaticum* поддерживать синтез вторичных малых РНК экспрессия целевого гена восстанавливалась после того, как все молекулы экзогенной дцРНК были истрачены. Продолжительность защитного эффекта препарата была дольше, если дцРНК изначально попадали в растения. Это объяснялось тем, что в растительных клетках в отличие от клеток гриба дцРНК могут амплифицироваться.

Способность дцРНК предотвращать и противодействовать инфекции *B. cinerea* проверена на винограде *Vitis vinifera*, где применялись три независимых подхода для доставки дцРНК, в частности с использованием в качестве мишени экспрессии грибной ген *BcDCL1/2* [71], а именно: опрыскивание листьев, адсорбция дцРНК на черешках и послеуборочное опрыскивание гроздей. Важно заметить все 3 метода снижали вирулентность *B. cinerea* и, соответственно, развитие серой гнили не только на растениях, но и плодах [141]. Торможение роста гриба *B. cinerea* на поверхности фруктов, овощей и цветов после их обработки дцРНК на основе генов *BcDCL1/2* показывает потенциал экзогенной дцРНК как нового поколения экологически безопасных препаратов для борьбы с патогенами и при хранении. Эти результаты демонстрируют, что дцРНК мобильна, а экзогенное применение дцРНК может послужить основой для разработки новых подходов в создании препаратов для защиты сельскохозяйственных культур, в том числе и от грибковых заболеваний, как в полевых условиях, так и в пост уборочный период. Причем, применение экзогенных дцРНК обеспечивает в полевых условиях более краткосрочную защиту в сравнении со временем послеуборочного хранения, где продукты не подвергаются воздействию ультрафиолетового излучения. Но, к сожалению

нию, эффективные протоколы для использования препаратов на основе дцРНК при хранении фруктов и овощей пока не определены.

В работе [90] описывается ряд примеров конструирования генно-инженерных векторов для запуска РНКи в растениях и подавления роста и развития патогенных грибов. Таким образом, экзогенное применение молекул дцРНК с потенциалом запуска РНКи — эффективный инструмент в современных платформах защиты и улучшения урожая. При явном положительном защитном эффекте целевых дцРНК в экспериментальных условиях остаются вопросы по подбору гиперпродукторов дцРНК, массовому накоплению целевого продукта, обеспечению его сохранности и использованию в полевых условиях и в условиях хранения. В обзорной работе [142] описано 9 вариантов доставки дцРНК в растения, преимущественно для защиты от насекомых, но по всей видимости некоторые из них можно применить и в отношении патогенов.

Так как специфичность РНКи зависит от идентичности последовательности между малыми РНК и мРНК-мишенями, существует риск нецелевого эффекта, который может привести к замалчиванию других транскриптов, содержащих достаточную гомологию с такими малыми РНК [143]. Можно разработать дцРНК, нацеливающиеся на несколько групп патогенов, как например произошло с дцРНК, нацеленными на ген $\beta 2$ -тубулина гриба *Fusarium asiaticum* [144]. Эти дцРНК проявили эффективность дополнительно и против *B. cinerea*, *M. oryzae* и *Colletotrichum truncatum* в клетках пшеницы, огурца, ячменя и сои соответственно [144], по всей видимости, связанной с относительно высокой консервативностью ДНК, ответственной за экспрессию соответствующего продукта и даже фрагмента (домена) этого продукта, с целью выключения которого подобрана конструкция. Но, поскольку такое отклонение от цели может произойти даже на хозяине, необходим внимательный подбор эффективных дцРНК к генам-мишеням, исключая их гомологию с другими нецелевыми хозяйскими транскриптами и генами эндоситной и симбиотрофной микробиоты. Искусственное снижение экспрессии гена *PhMLO1* действительно повысило устойчивость петунии к мучнистой росе, но нокдаун привел к плейотропным эффектам на рост и развитие, что говорит о необходимости внимательного отношения при разработке стратегий создания устойчивости петунии к возбудителю мучнистой росы с помощью РНКи [145]. По всей видимости, продукт гена *PhMLO1* кроме формирования чувствительности к мучнистой росе выполняет и другие важные физиологические функции в растении. К сожалению, пока представленные технологии можно применять только к культурам, доступным для эффективной трансформации. Кроме того, у общества все еще есть опасения по поводу потребления продуктов, полученных из генно-модифицирован-

ных организмов, находящихся под строгим контролем. Нельзя забывать и о разностороннем эффекте дцРНК в РНКи, связанных с генами, кодирующими белки рецепции и защиты.

При разработке стратегии противогрибковой защиты на основе РНКи необходимо учитывать жизненную важность гена-мишени. Так, дцРНК, полученная из нескольких областей гена Myosin 5 или b2-тубулина гриба *Fusarium asiaticum*, различалась по эффективности [146]. Использование *in vitro* дцРНК, направленных против генов, кодирующих аденилатциклазу, альфа и дельта субъединицы ДНК-полимеразы, грибов *F. oxysporum* f. sp. *cubense* и *Mycosphaerella fijiensis* показало их противогрибную активность [147]. Искусственный нокаут гена DMR6 (Downy Mildew Resistance 6) в растении базилика *Ocimum basilicum* с привлечением технологий CRISPR/Cas9 и РНКи подавлял развитие возбудителя ложной мучнистой росы до 93% [148].

Важным моментом в последующем использовании дцРНК в РНКи на основе СИГС в производственных целях является подходы к их наработке. На современном этапе показана возможность наработки дцРНК на культурах *E. coli* и *P. syringae*, а также в клетках дрожжей *Yarrowia lipolytica* и *Sacharomyces cerevisiae* [149]. Штамм *E. coli* HT115 (DE3), содержащий про-фаг λ DE3, кодирующий индуцируемый изопропил β -D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG) ген полимеразы T7 и дефицитный по РНКазе III, активно используется для получения большого количества дцРНК, с последующим автолизом эффективных против *Aspergillus flavus* [150]. Выделенная из такой линии бактерий дцРНК, успешно подавляла выработку грибных афлатоксинов [150]. Другая бактериальная культура *P. syringae* Van Hall, содержащая RdR бактериофага phi6 [151], позволяла синтезировать большие молекулы дцРНК (>2600 н.о.), стабильные которых поддерживалась до 20 дней [150]. Дрожжи *Y. lipolytica* показали себя как удобный производитель для производства и доставки дцРНК-ORF89 [148]. Экспрессионная система на основе культуры дрожжей *S. cerevisiae*, лишённых генов DCL-2 и AGO-2, оказалась также достаточно удобной и по эффективности сравнимой с бактериальными культурами [152].

В связи с важностью стабилизации дцРНК ряд работ показали возможность его осуществления с использованием наночастиц [138, 140]. В недавнем исследовании сообщалось о получении наногидрогеля, содержащего нуклеазу Cas9 и одноплавленную РНК [153]. Загрузка дцРНК в слоистые нанослои двойной гидроксидной глины позволяет обеспечить устойчивую их сохранность до 30 дней [154].

Симбионты и эндофиты. Симбионты и эндофиты могут быть как индукторами экспрессии претРНК через механизм ПАМП-индуцированного защитного ответа в растениях (ХИГС), так и

непосредственными генераторами дцРНК. Штамм *Bacillus* AR156 запускал устойчивость, подавляя накопление miR472 и активируя опосредованный белками, содержащими домен NB-LRR, иммунитет у арабидопсиса [155]. Инокуляция арабидопсиса клетками *B. amyloliquefaciens* FZB42 подавляла специфическую экспрессию miR846, индуцируя устойчивость через жасмонат-зависимый сигнальный путь [155]. В общей сложности обнаружено до 363 малых РНК, дифференциально экспрессируемых в кукурузе в ответ на инокуляцию штаммом FZB42 в сравнении с мутантами FZB42ΔsfpΔalss с подавленным синтезом сурфактина и не способными запускать фитозащитную реакцию [156]. Среди них четыре miРНК (zma-miR169a-5p, zma-miR169c-5p, zma-miR169i-5p и zma-miR395b-5p) были выбраны в качестве ассоциированных с устойчивостью растений к патогенам [156]. Многие эндофиты также способны давать дополнительные преимущества хозяевам, включая устойчивость к вредителям и патогенам за счет производства антибиотиков, антимикотических и антифидатных белков и метаболитов.

Потенциалом для исследований может быть также оценка работы РНКи в условиях формирования многоуровневого растительного метабиома, состоящего как минимум из растения и патогена и/или эндофита и/или симбионта. Поскольку феномен РНКи присущ всем эукариотам, следует ожидать, что при формировании тесных, в особенности паразитических и/или симбиотных отношений, этот защитный для отдельного организма, казалось бы, механизм отключения генов вступает во взаимодействие с подобным другого организма. С одной стороны, так как РНКи являются естественным и эффективно работает во всех taxa живых организмов, фитопатогены такую защиту легко обойти не смогут. С другой, поскольку при использовании экзогенных дцРНК целевые эффекты достигаются без изменения структуры генома хозяина, на них не должны распространяться правовые ограничения, связанные с ГМО. Правда, это не снимает вопросов перспективности и безопасности использования такого экономически выгодного подхода для укрепления устойчивости к вирусам, патогенам и вредителям, поскольку потенциал и безопасность метода приложений экзогенной дцРНК слабо исследованы, не все риски известны.

В отличие от других фитозащитных мероприятий, не только химических, но и биологических, очевидные риски для здоровья человека в случае применения технологии РНКи кажутся минимальными, поскольку присутствие молекул дцРНК не способствует накоплению каких-либо белковых продуктов и, следовательно, подход к использованию природного метода РНКи для “замалчивания” синтеза целевых белков считается более предпочтительным по сравнению с традиционными подходами создания генно-модифицированных организмов. Данные по функционированию РНКи

позволят разработать весьма эффективные стратегии борьбы с комплексом патогенов в агроценозе. Известные данные по РНКи говорят об ее эффективности против различных патогенов на сельскохозяйственных культурах и целевые дцРНК можно использовать в качестве базовой модели как удобный, экологически-безопасный и универсальный инструмент для борьбы с болезнями. Такой метод защиты растений может стать хорошей альтернативой синтетическим пестицидам.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ-аспирант № 20-34-90004.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fire A.Z.* // Cell Death Differ. 2007. V. 14. P. 1998–2012.
2. *Romano N., Macino G.* // Mol. Microbiol. 1992. V. 6. P. 3343–3353.
3. *Schuurs T.A., Schaeffer E.A., Wessels J.G.* // Genetics. 1997. V. 147. P. 589–596.
4. *Hamada W., Spanu P.D.* // Mol. Gen. Genet. 1998. V. 259. P. 630–638.
5. *Jorgensen R.A., Cluster P.D., English J., Que Q., Napoli C.A.* // Plant Mol. Biol. 1996. V. 31. № 5. P. 957–973.
6. *Yang L., Mu X., Liu C., Cai J., Shi K., Zhu W., Yang Q.* // J. Integr. Plant Mol. Biol. 2015. V. 57. № 12. P. 1078–1088.
7. *Huang C.Y., Wang H., Hu P., Hamby R., Jin H.* // Cell Host Microbe. 2019. V. 26. № 2. P. 173–182.
8. *Wang J., Mei J., Ren G.* // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. Art. 360.
9. *Dutta S., Kumar D., Jha S., Prabhu K.V., Kumar M., Mukhopadhyay K.* // Planta. 2017. V. 246. № 5. P. 939–957.
10. *Navarro L., Jay F., Nomura K., He S.Y., Voinnet O.* // Science. 2008. V. 321. № 5891. P. 964–967.
11. *Katiyar-Agarwal S., Jin H.* // Annu Rev Phytopathol. 2010. V. 48. P. 225–246.
12. *Zhang T., Zhao J.H., Fang Y.Y., Guo H.S., Jin Y.* // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 5. Art. 2742.
13. *Tao Z., Liu H., Qiu D., Zhou Y., Li X., Xu C., Wang S.* // Plant Physiology. 2009. V. 151. № 2. P. 936–948.
14. *Derbyshire M., Mbengue M., Barascud M., Navaud O., Raffaele S.* // Mol. Plant Pathol. 2019. V. 20. № 9. P. 1279–1297.
15. *Zhang H., Tao Z., Hong H., Chen Z., Wu C., Li X., Xiao J., Wang S.* // Nat Plants. 2016. V. 2. Art. 16016.
16. *Salamon S., Żok J., Gromadzka K., Błaszczuk L.* // Pathogens. 2021. V. 10. № 11. Art. 1461.
17. *Li F., Pignatta D., Bendix C., Brunkard J.O., Cohn M.M., Tung J., Sun H., Kumar P., Baker B.* // PNAS USA. 2012. V. 109. № 5. P. 1790–1795.
18. *Fukudome A., Kanaya A., Egami M., Nakazawa Y., Hiraguri A., Moriyama H., Fukuhara T.* // RNA. 2011. V. 17. № 4. P. 750–760.
19. *Xiong Q., Ye W., Choi D., Wong J., Qiao Y., Tao K., Wang Y., Ma W.* // Mol. Plant Microbe Interact. 2014. V. 27. № 12. P. 1379–89.
20. *Vetukuri R.R., Whisson S.C., Grenville-Briggs L.J.* // Eur. J. Plant Pathol. 2017. V. 149. P. 771–777.

21. *de Vries S., de Vries J., Rose L.E.* // Genes. 2019. V. 10. № 4. P. 310.
22. *Yin C., Ramachandran S.R., Zhai Y., Bu C., Pappu H.R., Hulbert S.H.* // New Phytol. 2019. V. 222. № 3. P. 1561–1572.
23. *Wang B., Sun Y., Song N., Zhao M., Liu R., Feng H., Wang X., Kang Z.* // New Phytol. 2017. V. 215. № 1. P. 338–350.
24. *Hou Y., Zhai Y., Feng L., Karimi H.Z., Rutter B.D., Zeng L. et al.* // Cell Host Microbe. 2019. V. 25. P. 153–165.
25. *Natarajan B., Kalsi H.S., Godbole P., Malankar N., Thiagarayaseelam A., Siddappa S., et al.* // J. Exp. Bot. 2018. V. 69. № 8. P. 2023.
26. *Luan Y., Cui J., Li J., Jiang N., Liu P., Meng J.* // Planta 2018. V. 247. P. 127.
27. *Yang L., Jue D., Li W., Zhang R., Chen M., Yang Q.* // PLoS ONE. 2013. V. 8. Art. e72840.
28. *Mu X.Y., Liu X.R., Cai J.H., Zhu W.J., Wang Z., Yang Q., You X.* // Russ. J. Plant Physiol. 2018. V. 65. P. 203–210.
29. *Yu X., Hou Y., Chen W., Wang S., Wang P., Qu S.* // Plant Cell Physiol. 2017. V. 58. № 9. P. 1541.
30. *Shen D., Suhrkamp I., Wang Y., Liu S., Menkhaus J., Verreet J.A., Fan L., Cai D.* // New Phytol. 2014. V. 204. P. 577–594.
31. *Zhang H., Yu P., Zhao J., Jiang H., Wang H., Zhu Y. et al.* // New Phytol. 2018. V. 217. P. 799–812.
32. *Cao J.Y., Xu Y.P., Zhao L., Li S.S., Cai X.Z.* // Plant Mol. Biol. 2016. V. 92. P. 39–55.
33. *Yang L., Mu X., Liu C., Cai J., Shi K., Zhu W., Yang Q.* // J. Integr. Plant Biol. 2015. V. 57. P. 1078–1088.
34. *Han G.Z.* // New Phytol. 2019. V. 222. № 1. P. 70.
35. *Ouyang S., Park G., Atamian H.S., Han C.S., Stajich J.E., Kaloshian I., Borkovich K.A.* // PLoS Pathog. 2014. V. 10. № 10. Art. e1004464.
36. *de Vries S., Kloesges T., Rose L.E.* // Genome Biol Evol. 2015. V. 7. № 12. P. 3307–3321.
37. *Wu F., Xu J., Gao T., Huang D., Jin W.* // BMC Plant Biol. 2021. V. 21. № 1. Art. 496.
38. *Han G., Cheng C., Zheng Y., Wang X., Xu Y., Wang W. et al.* // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. Art. 4491.
39. *Zhang H., Chen X., Wang C., Xu Z., Wang Y., Liu X. et al.* // Mol. Biol. Rep. 2013. V. 40. P. 6245–6253.
40. *Coursey T., Regedanz E., Bisaro D.M.* // J. Virol. 2018. V. 92.
41. *Liu B., Li P., Li X., Liu C., Cao S., Chu C., Cao X.* // Plant Physiol. 2005. V. 139. P. 296–305.
42. *Zhang B.S., Li Y.C., Guo H.S., Zhao J.H.* // Front. Plant Sci. 2022. V. 13. Art. 847086.
43. *Wang Q., An B., Hou X., Guo Y., Luo H., He C.* // Front. Microbiol. 2018. V. 8. Art. 2621.
44. *Yin C., Zhu H., Jiang Y., Shan Y., Gong L.* // Cells. 2020. V. 9. P. 363.
45. *Alazem M., Lon N.-Sh.* // Curr. Opin. Vir. 2020. V. 42. P. 1.
46. *Matzke M.A., Kanno T., Matzke A.J.* // Annu. Rev. Plant Biol. 2015. V. 66. P. 243–267.
47. *Xin Y., Ma B., Zeng Q., He W., Qin M., He N.* // Horticult Res. 2021. V. 8. № 1. Art. 154.
48. *Cambiagno D.A., Torres J.R., Alvarez M.E.* // Front. Plant Sci. 2021. V. 12. Art. 703667.
49. *Lopez Sanchez A., Stassen J.H., Furci L., Smith L.M., Ton J.* // Plant J. 2016. V. 88. P. 361–374.
50. *Luna E., Ton J.* // Plant Signal. Behav. 2012. V. 7. P. 615–618.
51. *Schumann U., Lee J.M., Smith N.A., Zhong C., Zhu J.K., Dennis E.S. et al.* // Epigenetics. 2019. V. 14. P. 1074–1087.
52. *Kong W., Xia X., Wang Q., Liu L.W., Zhang S., Ding L. et al.* // Front. Genet. 2020. V. 11. Art. 460.
53. *Saripalli G., Sharma C., Gautam T., Singh K., Jain N., Prasad P. et al.* // Mol. Biol. Rep. 2020. V. 47. P. 1339–1360.
54. *Geng S., Kong X., Song G., Jia M., Guan J., Wang F. et al.* // Phytol. 2019. V. 221. P. 1023–1035.
55. *Morán-Diez M.E., Martínez de Alba Á.E., Rubio M.B., Hermosa R., Monte E.* // J. Fungi. 2021. V. 7. P. 318–331.
56. *Srikant T., Drost H.G.* // Front. Plant Sci. 2021. V. 11. Art. 606800.
57. *Kinoshita T., Seki M.* // Plant Cell Physiol. 2014. V. 55. P. 1859–1863.
58. *Hubbard M., Germida J., Vujanovic V.* // J. Appl. Microbiol. 2014. V. 116. № 1. P. 109–122.
59. *Espinás N.A., Saze H., Saijo Y.* // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. Art. 1201.
60. *Mallory A., Vaucheret H.* // Plant Cell. 2010. V. 22. P. 3879–3889.
61. *Matzke M., Mosher R.* // Nat. Rev. Genet. 2014. V. 15. P. 394–408.
62. *Astier-Manificier S., Cornuet P.* // Biochim. Biophys. Acta Nucleic Acids Protein Synth. 1971. V. 232. P. 484–493.
63. *Terefe-Ayana D., Yasmin A., Le T.L., Kaufmann H., Biber A., Kühr A., Linde M., Debener T.* // Front. Plant Sci. 2011. V. 2. P. 35.
64. *Nunes C.C., Dean R.A.* // Mol. Plant Pathol. 2012. V. 13. P. 519–529.
65. *Lewsey M.G., Hardcastle T.J., Melnyk C.W., Molnar A., Valli A.A., Urich M.A., Nery J.R., Baulcombe D.C., Ecker D.C.* // PNAS USA. 2016. V. 113. Art. 801–810.
66. *Fang Y., Wang Z., Liu X., Tyler B.M.* // Front. Microbiol. 2022. V. 13. Art. 817844.
67. *De Palma M., Ambrosone A., Leone A., Del Gaudio P., Ruocco M., Turidák L. et al.* // Plants. 2020. V. 9. P. 1777–1791.
68. *Zhang T., Zhao Y.L., Zhao J.H., Wang S., Jin Y., Chen Z.Q. et al.* // Nat Plants. 2016. V. 2(10). Art. 16153.
69. *Rutter B.D., Innes R.W.* // Plant Physiol. 2017. V. 173. P. 728–741.
70. *Jiao J., Peng D.* // J. Plant Interact. 2018. V. 13. P. 514–521.
71. *Wang M., Weiberg A., Lin F.M., Thomma B.P., Huang H.D., Jin H.* // Nature Plants. 2016. V. 2. № 10. Art. 16151.
72. *Ji H.M., Mao H.Y., Li S.J., Feng T., Zhang Z.Y., Cheng L. et al.* // New Phytol. 2021. V. 232. № 2. P. 705–718.
73. *Wytinck N., Manchur C.L., Li V.H., Whyard S., Belmonte M.F.* // Plants. 2020. V. 9. Art. 1780.
74. *Melnyk C.W., Molnar A., Baulcombe D.C.* // EMBO J. 2011. V. 30. P. 3553–3563.
75. *Wang M., Dean R.A.* // Mol. Plant Pathol. 2020. P. 21. P. 589–601.
76. *Liu G., Kang G., Wang S., Huang Y., Cai Q.* // Front. Plant Sci. 2021. V. 12. Art. 757925.

77. Villalobos—Escobedo J.M., Herrera—Estrella A., Carreras—Villaseñor N. // *Mycologia*. 2016. V. 108. № 3. P. 556—571.
78. Lax C., Tahiri G., Patiño—Medina J.A., Cánovas—Márquez J.T., Pérez—Ruiz J.A., Osorio—Concepción M. et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 24. Art. 9348.
79. Qian X., Hamid F.M., El Sahili A., Darwis D.A., Wong Y.H., Bhushan S. et al. // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. P. 9295—9309.
80. Nguyen Q.B., Kadotani N., Kasahara S., Tosa Y., Mayama S., Nakayashiki H. // *Mol. Microbiol.* 2008. V. 68. P. 1348—1365.
81. Kunej U., Jakše J., Radišek S., Štajner N. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. Art. 4224.
82. Chen Y., Gao Q., Huang M., Liu Y., Liu Z., Liu X., Ma Z. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. Art. 12500.
83. Werner B.T., Koch A., Šečić E., Engelhardt J., Jelonek L., Steinbrenner J. et al. // *PLoS ONE* 2021. V. 16. № 8. Art. e0252365.
84. Neupane A., Feng C., Mochama P.K., Saleem H., Lee Marzano S.Y. // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. Art. 976.
85. Mochama P., Jadhav P., Neupane A., Marzano S.Y.L. // *Viruses*. 2018. V. 10. Art. 214.
86. Jo S.M., Ayukawa Y., Yun S.H., Komatsu K., Arie T. // *J. Gen. Plant Pathol.* 2018. V. 84. P. 395—398.
87. Campo S., Gilbert K.B., Carrington J.C. // *PLoS Pathog.* 2016. V. 12. Art. e1005640.
88. Jeseničnik T., Štajner N., Radišek S., Mishra A.K., Košmelj K., Kunej U., Jakše J. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 2. Art. 900.
89. Feng H., Xu M., Liu Y., Gao X., Yin Z., Voegelé R.T., Huang L. // *For. Pathol.* 2017. V. 47. Art. E12354.
90. Borah M., Konakalla N.C. // *Emerging Trends in Plant Pathology*. Springer, Singapore. 2021. C. 561—575.
91. Dunker F., Trutzenberg A., Rothenpieler J.S., Kuhn S., Pröls R., Schreiber T. et al // *Elife*. 2020. V. 9. Art. e56096.
92. Mascia T., Labarile R., Doohan F., Gallitelli D. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. Art. 2657.
93. Ye W., Jiang J., Lin Y., Yeh K.-W., Lai Z., Xu X., Oelmüller R. // *BMC Plant Biol.* 2019. V. 19. P. 1—16.
94. Raman V., Simon S.A., Demirci F., Nakano M., Meyers B.C., Donofrio N.M. // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2017. V. 30. P. 517—530.
95. Wong-Bajracharya J., Singan V.R., Monti R., Plett K.L., Ng V., Grigoriev I.V. et al // *PNAS USA*. 2022. V. 119. № 3. Art. e2103527119.
96. Bazin J., Khan G.A., Combier J.P., Bustos-Sanmamed P., Debernardi J.M., Rodriguez R. et al. // *Plant J.* 2013. V. 74. P. 920—934.
97. Couzigou J.M., Laouressgues D., André O., Gutjahr C., Guillotin B., Bécard G., Combier J.P. // *Cell Host Microbe*. 2017. V. 21. P. 106—112.
98. Etemadi M., Gutjahr C., Couzigou J.-M., Zouine M., Laouressgues D., Timmers A. et al // *Plant Physiol.* 2014. V. 166. P. 281—292.
99. Wu P., Wu Y., Liu C.C., Liu L.W., Ma F.F., Wu X.Y. et al. // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. Art. 429.
100. Dang Y., Yang Q., Xue Z., Liu Y. // *Eukaryotic Cell*. 2011. V. 10. № 9. P. 1148—1155.
101. Choi J., Kim K.T., Jeon J., Wu J., Song H., Asiegbu F.O., Lee Y.H. // *BMC Genom.* 2014. V. 15. Art. S14.
102. Yadav V., Sun S., Billmyre R.B., Thimmappa B.C., Shea T., Lintner R. et al. // *PNAS USA*. 2018. V. 115. P. 3108—3113.
103. Третьякова П.Я., Соловьев А.А. // *Экологическая генетика*. 2020. Т. 18. № 4. С. 467—481.
104. Matsuo Y., Novianti F., Takehara M., Fukuhara T., Arie T., Komatsu K. // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2019. V. 32. P. 1475.
105. Lee W.S., Fu S.F., Li Z., Murphy A.M., Dobson E.A., Garland L. et al. // *BMC Plant Biol.* 2016. V. 16. Art. 15.
106. Diao P., Zhang Q., Sun H., Ma W., Cao A., Yu R. et al. // *Genes (Basel)*. 2019. V. 10. № 7. Art. 526.
107. Hunter L.J.R., Brockington S.F., Murphy A.M., Pate A.E., Gruden K., MacFarlane S.A., Palukaitis P., Carr J.P. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. Art. 23082.
108. Qin L., Mo N., Zhang Y., Muhammad T., Zhao G., Zhang Y., Liang Y. // *Front Plant Sci.* 2017. V. 8. Art. 1068.
109. Prakash V., Chakraborty S. // *Physiol Mol Biol Plants*. 2019. V. 25. № 4. P. 1055.
110. Pradhan M., Pandey P., Baldwin I.T., Pandey S.P. // *Plant Physiol.* 2020. V. 184. № 2. P. 1128—1152.
111. Downen R.H., Pelizzola M., Schmitz R.J., Lister R., Downen J.M., Nery J.R., Dixon J.E., Ecker J.R. // *PNAS USA*. 2012. V. 109. № 32. Art. E2183-91.
112. Maksimov I.V. // *Rus. J. Plant Physiol.* 2009. T. 56. № 6. С. 742—752.
113. Westwood J.H., Mccann L., Naish M., Dixon H., Murphy A.M., Stancombe M.A. et al. // *Mol. Plant Pathol.* 2013. V. 14. P. 158.
114. Panwar V., McCallum B., Bakkeren G. // *Plant Mol. Biol.* 2013. V. 81. P. 595—608.
115. Jahan S.N., Asman A.K., Corcoran P., Fogelqvist J., Vetukuri R.R., Dixelius C. // *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. P. 2785—2794.
116. Vega-Arreguin J.C., Jalloh A., Bos J.I., Moffett P. // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2014. V. 27. P. 770—780.
117. Song Y., Thomma B.P. // *Mol. Plant Pathol.* 2018. V. 19. P. 77—89.
118. Coburn G.A., Cullen B.R. // *J. Antimicrobial Chemotherapy*. 2003. V. 51/ № 4. P. 753—756.
119. Sang H., Kim J.-I. // *Plant Biotechnol. Rep.* 2020. V. 14. P. 1—8.
120. Cheng W., Song X.-S., Li H.-P., Cao L.-H., Sun Ke., Qiu X.-L. et al // *Plant Biotechnol. J.* 2015. V. 9. P. 1335—1345.
121. Tiwari I.M., Jesuraj A., Kamboj R., Devanna B.N., Bottella J.R., Sharma T.R. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. Art. 7521.
122. Panwar V., Jordan M., McCallum B., Bakkeren G. // *Plant Biotechnol. J.* 2018. V. 16. P. 1013—1023.
123. Tetorya M., Rajam M.V. // *3 Biotech*. 2021. V. 11. Art. 443.
124. Zhang J., Khan S.A., Hasse C., Ruf S., Heckel D.G., Bock R. // *Science*. 2015. V. 347. P. 991—994.
125. Qi T., Zhu X., Tan C., Liu P., Guo J., Kang Z., Guo J. // *Plant Biotechnol. J.* 2018. V. 16. P. 797—807.
126. Nowara D., Gay A., Lacomme C., Shaw J., Ridout C., Douchkov D. et al. // *Plant Cell*. 2010. V. 22. P. 3130—3141.
127. Acevedo-Garcia J., Spencer D., Thieron H., Reinstädler A., Hammond-Kosack K., Phillips A.L., Panstruga R. // *Plant Biotechnol. J.* 2017. V. 15. № 3. P. 367—378.

128. Várallyay É., Giczey G., Burgyán J. // Arch. Virol. 2012. V. 157. P. 1345–1350.
129. Wang Y., Cheng X., Shan Q., Zhang Y., Liu J., Gao C., Qiu J.-L. // Nat. Biotechnol. 2014. V. 32. P. 947–951.
130. 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.
131. Xin M., Wang Y., Yao Y., Xie C., Peng H., Ni Z., Sun Q. // BMC Plant Biol. 2010. V. 10. P. 123–134.
132. Kamthan A., Chaudhuri A., Kamthan M., Datta A. // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. Art. 208.
133. Kouzai Y., Nakajima K., Hayafune M., Ozawa K., Kaku H., Shibuya N., et al. // Plant Mol Biol. 2014. V. 84. № 4-5. P. 519.
134. Johnson E.T., Proctor R.H., Dunlap C.A., Busman M. // Mycotoxin Res. 2018. V. 34. Art. 29.
135. Koch A., Wassenegger M. // New Phytol. 2021. V. 231. № 1. P. 54–59.
136. Biedenkopf D., Will T., Knauer T., Jelonek L., Furch A.C.U., Busche T., Koch A. // ExRNA. 2020. V. 2. Art. 12.
137. Song X.-S., Gu K.-X., Duan X.-X., Xiao X.-M., Hou Y.-P., Duan Y.-B. et al. // Pestic. Biochem. Physiol. 2018. V. 150. P. 1–9.
138. Gebremichael D.E., Haile Z.M., Negrini F., Sabbadini S., Capriotti L., Mezzetti B., Baraldi E. // Plants 2021. V. 10. Art. 650.
139. McLoughlin A.G., Wytinck N., Walker P.L., Girard I.J., Rashid K.Y., de Kievit T. et al. // Sci. Rep. 2018. V. 8. № 1. Art. 7320.
140. Werner B.T., Gaffar F.Y., Schuemann J., Biedenkopf D., Koch A.M. // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 476.
141. Nerva L., Sandrini M., Gambino G., Chitarra W. // Biomolecules. 2020. V. 10. Art. 200.
142. Hernandez-Soto A., Chacon-Credas R. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. Art. 12148.
143. Casacuberta J.M., Devos Y., du Jardin P., Ramon M., Vaucheret H., Nogué F. // Trends Biotechnol. 2015. V. 33. P. 145–147.
144. Gu K.X., Song X.S., Xiao X.M., Duan X.X., Wang J.X., Duan Y.B. et al. // Pest. Biochem. Physiol. 2019. V. 153. P. 36–46.
145. Jiang P., Chen Y., Wilde H.D. // Sci. Hortic. 2016. V. 201. P. 225–229.
146. Šečić E., Kogel K.H. // Cur. Opin. Biotechnol. 2021. V. 70. P. 136–142.
147. Mumbanza F.M., Kiggundu A., Tusiime G., Tushemereirwe W.K., Niblett C., Bailey A. // Pest Manag. Sci. 2013. V. 69. P. 1155–1162.
148. Hasley J.A.R., Navet N., Tian M. // PLOS One. 2021. V. 16. Art. e0253245.
149. Álvarez-Sánchez A.R., Romo-Quinones C., Rosas-Quijano R., Reyes A.G., Barraza A., Magallón-Barajas F. et al. // Aquac. Res. 2018. V. 49. P. 480–491.
150. Guan R., Chu D., Han X., Miao X., Li H. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2021. V. 9. Art. 753790.
151. Niehl A., Soininen M., Poranen M.M., Heinlein M. // Plant Biotechnol. J. 2018. V. 16. P. 1679–1687.
152. Drinnenberg I.A., Weinberg D.E., Xie K.T., Mower J.P., Wolfe K.H., Fink G.R., Bartel D.P. // Science. 2009. V. 326. P. 544–550.
153. Ding F., Huang X., Gao X., Xie M., Pan G., Li Q. et al. // Nanoscale. 2019. V. 11. № 37. P. 17211–17215.
154. Mitter N., Worrall E.A., Robinson K.E., Xu Z.P., Carroll B.J. // Curr. Opin. Virol. 2017. V. 26. P. 49–55.
155. Jiang C., Fan Z., Li Z., Niu D., Li Y., Zheng M. et al. // Mol. Plant Pathol. 2020. V. 21. P. 854–870.
156. Kang S., Sun D., Qin J., Guo L., Zhu L., Bai Y. et al. // J. Pest Sci. 2022. V. 95. P. 101–114.

RNA Interference in Plant Protection from Fungal and Oomycet Infection

I. V. Maksimov^a, *, M. Yu. Shein^a, and G. F. Burkhanova^a

^a Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Federal Research Center of Russian Academy of Sciences, Ufa 450054 Russia

*e-mail: igor.mak2011@yandex.ru

Phytopathogenic fungi pose a threat to food security, limiting the biological potential of agricultural crops and reducing the quality of products. New plant protection methods based on natural systemic and cellular phytoimmunity are being developed to date, where a unique mechanism, described by the term “RNA interference” (RNAi), occupies a special place. RNAi regulates the expression of target genes in a homologously dependent manner and, with the involvement of a protein complex designated as RISC (RNA-induced silencing complex), on the one hand, it protects plants from pathogens, but on the other hand, pathogens use it as a virulence factor. Cases of bilateral exchange of small RNAs between plants and pathogens affecting them through extracellular vesicles have been described. This review discusses the role of small RNAs, as well as DCL, AGO, and RdR proteins, in the infection of plants with pathogenic fungi and oomycetes, and the prospects for using RNAi in the development of environmentally friendly, modern plant protection products.

Keywords: RNA interference, phytoimmunity