

УДК 591.23

## СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ПОВЫШЕНИЮ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ВРЕДИТЕЛЯМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

© 2019 г. А. Г. Викторов<sup>1</sup>

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт проблем экологии и эволюции имени А.И. Северцова РАН, Москва, Россия

Поступила в редакцию 20.12.2017 г.

После доработки 15.01.2018 г.

Принята к публикации 15.01.2018 г.

Разработка ГМ-растений со встроенной системой защиты от вредителей – одно из основных направлений сельскохозяйственной биотехнологии. С середины 90-х годов XX века до настоящего времени большинство трансгенных культур представлено сортами, несущими инсектицидные (*Cry*- и *Vip*-) гены бактерии *Bacillus thuringiensis*. Тем не менее, в последнее десятилетие заметна тенденция к переходу на встроенные системы защиты, основанные на механизме РНК-интерференции. Обсуждаются пути эволюционного ответа фитофагов на инсектицидные ГМ-растения, оснащенные подобными генетическими конструкциями.

**Ключевые слова:** ГМ-растения – фитофаги – фитопатогены – *Cry*-белки – *Vip*-белки – R-гены – РНК-интерференция – дцРНК

**DOI:** 10.1134/S0015330319010184

### ВВЕДЕНИЕ

Ежегодно в мире около 30% урожая сельскохозяйственных культур гибнет на полях от вредных насекомых, фитопатогенных грибов, микроорганизмов и вирусов. Не удивительно, что одной из главных задач геномной инженерии стало создание биотехнологических растений со встроенной защитой от вредителей (Plant Incorporated Protectants или PIP). За всю историю геномной инженерии в разных странах мира было выдано разрешение на неограниченное использование 49 событиям трансформации у 12 видов растений. 37 из них (все *Cry*- и *Vip*-гены, а также дцРНК) нацелены на представителей класса Insecta. Единственное событие трансформации с использованием R-гена направлено против фитопатогенного оомицета – возбудителя фитофтороза у картофеля. Все остальные события нацелены на фитопатогенные вирусы с использованием генов, кодирующих их белки (в большинстве случаев белки вирусной оболочки), и, как в случае с дцРНК, используют механизм РНК-интерференции. Показательно, что за более чем 20-летнее использование ГМ-культур со встроенной защитой от вредителей, разрешение на коммерческое использование было отозвано

только у пяти событий трансформации: все они относятся к случаям генетической модификации кукурузы *Cry*-генами (табл. 1) [1–3].

### CRY-ГЕНЫ

*Cry*-гены ( $\delta$ -эндотоксин-кодирующие) грамположительной аэробной спорообразующей бактерии *Bacillus thuringiensis* первыми стали использовать для конструирования инсектицидных ГМ-растений. Работы по генетической трансформации проводились на всех основных с.-х. культурах, но разрешение на промышленное использование получили только тридцать четыре события трансформации у шести с.-х. культур (см. табл. 2). Однако в конце 90-х годов (буквально через пару лет после внедрения в производство) *Vt*-картофель из-за жалоб потребителей перестал выращиваться, хотя и не был запрещен, *Vt*-соя в производство не пошла, и в настоящее время масштабно используются только *Vt*-сорта кукурузы и хлопчатника. Кроме того, с 2007 г. в Китае в незначительных объемах высевается *Vt*-тополь (543 га в 2016 г.) и с 2014 г. в Бангладеш – *Vt*-баклажан (700 га в 2016 г.) [2].

Белки, кодируемые *Cry*-генами, вызывают образование пор в эпителии кишечника личинок насекомых, его лизис и в конечном итоге смерть. В норме *Vt*-гены дикого типа не могут эффективно функционировать в растениях, поскольку они

<sup>1</sup> Адрес для корреспонденции: Викторов Александр Георгиевич. 119071, Москва, Ленинский проспект, 33. Институт проблем экологии и эволюции имени А.И. Северцова РАН. Факс: (495) 954-55-34; электронная почта: aleviktorov@ya.ru

**Таблица 1.** ГМ-растения со встроенной системой защиты, разрешенные для коммерческого использования

№	Культуры	Количество событий трансформации (из них впоследствии запрещенных)					
		<i>Cry</i> -гены	<i>Vip</i> -гены	R-гены	дцРНК	гены, кодирующие вирусные белки	всего
1	Кукуруза ( <i>Zea mays</i> L.)	18 (5)	1	—	1	—	20 (5)
2	Хлопчатник ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.)	8	1	—	—	—	9
3	Соя ( <i>Glycine max</i> L.)	5	—	—	—	—	5
4	Картофель ( <i>Solanum tuberosum</i> L.)	1	—	1	—	1	3
5	Баклажан ( <i>Solanum melongena</i> L.)	1	—	—	—	—	1
6	Слива ( <i>Prunus domestica</i> L.)	—	—	—	—	1	1
7	Перец сладкий ( <i>Capsicum annuum</i> L.)	—	—	—	—	1	1
8	Папайя ( <i>Carica papaya</i> L.)	—	—	—	—	5	5
9	Помидор ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.)	—	—	—	—	1	1
10	Тополь ( <i>Populus nigra</i> L.)	1	—	—	—	—	1
11	Тыква ( <i>Cucurbita pepo</i> L.)	—	—	—	—	1	1
12	Фасоль ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	—	—	—	—	1	1
	Всего	34 (5)	2	1	1	11	49 (5)

**Таблица 2.** ГМ-растения, трансформированные *Cry*-генами, разрешенные для коммерческого использования

№	Гены	Количество событий трансформации (из них впоследствии запрещенных)						
		кукуруза	хлопчатник	soя	картофель	баклажан	тополь	итого
1	<i>Cry1ab</i>	4 (2)	2	—	—	—	—	6 (2)
2	<i>Cry1ac</i>	1 (1)	3	2	—	1	1	8 (1)
3	<i>Cry1f</i>	2	1	1	—	—	—	4
4	<i>Cry1fa2</i>	1	—	—	—	—	—	1
5	<i>Cry2ab2</i>	—	1	1	—	—	—	2
6	<i>Cry2ae</i>	—	1	—	—	—	—	1
7	<i>Cry2bb2</i>	1	—	—	—	—	—	1
8	<i>Cry3a</i>	1	—	—	1	—	—	2
9	<i>Cry3bb1</i>	3 (1)	—	—	—	—	—	3 (1)
10	<i>Cry9ca</i>	1 (1)	—	—	—	—	—	1 (1)
11	<i>Cry1a.105</i>	1	—	1	—	—	—	2
12	<i>mCry3A</i>	1	—	—	—	—	—	1
13	<i>eCry3.1Ab</i>	1	—	—	—	—	—	1
14	<i>Cry34ab1/Cry35ab1</i>	1	—	—	—	—	—	1
	Итого	18 (5)	8	5	1	1	1	34(5)

отличаются от генов эукариот рядом особенностей. Одна из них заключается в том, что в генах высших растений третья пара кодона представлена парой G-C практически в половине случаев (у хлопчатника обыкновенного *Gossypium hirsutum* — 44.61%, у кукурузы *Zea mays* — 51.87%), в то время как у *B. thuringiensis* — только в четверти случаев

[4]. Поскольку изоакцепторная тРНК коэволюционировала с частотой кодонов, то низкий уровень экспрессии прокариотических генов в ГМ-растениях связан с тем, что молекулы тРНК, соответствующие кодонам генов бактерий, присутствуют в растительных клетках в недостаточном количестве. Поэтому для получения высокого уров-

ня экспрессии *Cry*-генов в растениях, кодоны бактериального гена заменяются синонимичными кодонами растения-хозяина. Эти субституции позволяют во много раз повышать трансляцию *Vt*-токсина. Так, например, ген *CryIab* с полностью замененными бактериальными кодонами имел уровень экспрессии в трансгенных помидорах в 100 раз выше по сравнению с геном дикого типа [5]. Однако даже такой показатель может быть недостаточен для реализации стратегии “рефугиев – высоких доз”, лежащей в основе концепции использования инсектицидных *Vt*-растений. В соответствии с этой стратегией концентрация *Cry*-белков в растительных тканях должна находиться на уровне, в 25 раз превышающем летальную дозу для чувствительных (нерезистентных) фитофагов. Только при этом условии очень редкие функционально доминантные мутации резистентности превращаются в функционально рецессивные и, следовательно, не будут проявляться и, соответственно, поддерживаться отбором (явление подобной модификации доминантности было ранее описано для синтетических органических пестицидов) [6]. Однако исследования *Vt*-сортов кукурузы со всеми основными событиями трансформации, нацеленными на основного вредителя кукурузы в Северной Америке – западного кукурузного корневого червя (личинки жука) *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Chrysomelidae: Galerucinae) показали, что экспрессия *Cry*-генов в них не дотягивает до необходимого показателя. С этим обстоятельством, в числе прочих, связано быстрое распространение мутаций резистентности к *Vt*-токсинам в североамериканской популяции *D. virgifera* [7–9].

Высокий уровень экспрессии *Cry*-генов, столь необходимый для экономической эффективности *Vt*-кукурузы, может быть крайне опасен для полезных и охраняемых видов насекомых, обитающих в естественных биоценозах в окрестностях ее полей. В 2003 г. было прекращено выращивание ГМ-сортов кукурузы, в которых использовалось событие трансформации *Vt176*, так как ранее было показано, что смертность половины популяции гусениц булавоусой бабочки *Danaus plexippus* L. наступает при поедании от 13 до 36 (в зависимости от возраста гусениц) зерен пыльцы этих растений (сортов, основанные на событиях трансформации *Vt11* и *Mon810*, остались в производстве, так как в их пыльце концентрация белка *Cry1Ab* была на один–два порядка ниже, нежели в пыльце *Vt176* [1, 10].

Следует отметить, что, среди возделываемых в промышленных масштабах инсектицидных культур, *Vt*-кукуруза представляет собой наибольшую опасность для полезных и охраняемых видов насекомых. Это связано с тем, что, в отличие от других инсектицидных растений, она опыляется ветром, и потому у нее образуется много пыльцы, которая

разносится на большие расстояния и попадает как в сухопутные, так и пресноводные экосистемы. В случае *Vt*-кукурузы *MON810* одно растение производит 492 мг пыльцы, а 1 га кукурузного поля, соответственно, 35 кг [11]. В среднем *Vt*-кукуруза производит в 1500–2000 раз больше *Cry*-белков, нежели в случае его распыления при однократной обработке полей химикатами типа *DIPEL*, содержащими *Vt*-токсин. Многолетние исследования рассеивания кукурузной пыльцы в Германии показали, что даже на расстоянии 1 км от кукурузного поля происходит выпадение пыльцы в количестве  $10^5$  зерен на  $1 \text{ м}^2$ . Эти данные заставили более чем на порядок увеличить буферные зоны между полями *Vt*-кукурузы и особо охраняемыми природными территориями [12, 13].

Существует принципиальное различие между белками, которые производят *Cry*-гены дикого типа и генно-инженерные *Cry*-гены. Первые кодирует протоксин, который, для того чтобы стать токсином, должен пройти процесс протеолитической активации; вторые – генно-инженерную версию активированного токсина. Протоксин и активированный генно-инженерный токсин отличаются друг от друга своим поведением не только в биоте, но и в абиоте. Кристаллы протоксинов достаточно быстро деградируют под лучами солнца, в то время как активированный токсин легко адсорбируется почвенными частицами и сохраняет активность в педосфере в течение года [14]. Таким образом, отсутствие “предохранителя” (протеолитической активации) и длительное нахождение в окружающей среде расширяет круг нецелевого действия генно-инженерных *Cry*-белков. Долгое время считалось, что действие *Vt*-токсинов отряд-специфично: белки групп *Cry1*, *Cry2* и *Cry9* токсичны лишь для личинок Чешуекрылых (Lepidoptera), а *Cry3* – для личинок Жесткокрылых (Coleoptera). Однако сейчас известно, что из 14 *Vt*-токсинов, экспрессирующихся в трансгенных растениях, три имеют спектр активности, далеко выходящий за пределы одного (целевого) отряда насекомых. Из них наиболее “универсальным” проявляет себя белок *Cry1Ab*. Его нецелевое действие преодолевает таксономические границы типа Членистоногих (Arthropoda) и распространяется на представителей типов Кольчатых червей (Annelida) и Моллюсков (Mollusca) (табл. 3) [15].

Пыльца *Vt*-кукурузы представляет угрозу не только для фитофагов и сапрофагов. При оценке негативных эффектов выращивания трансгенных культур долгое время не учитывался феномен зоофитофагии, наблюдаемый у ряда хищных насекомых и, прежде всего, личинок божьих коровок (Coleoptera: Coccinellidae), переключающихся на некоторое время на растительную пищу. Отрицательное воздействие (увеличение срока развития) было показано на личинках божьей коровки *Propylaea japonica* Thunberg, питавшихся пыльцой

**Таблица 3.** Нецелевое действие Cry-белков на представителей различных отрядов беспозвоночных

Bt-токсины	Количество отрядов в соответствующих классах животных					
	Oligochaeta	Gastropoda	Crustacea	Arachnea	Entognatha	Insecta
Cry1Ab	1	1	3	2	1	8
Cry1Ac			1		1	7
Cry3Aa					1	5

Bt-хлопчатника (Cry1Ab) [16]. В лабораторных опытах повышенная (до 50%) смертность личинок божьей коровки *Adalia bipunctata* наблюдалась при питании искусственной диетой, содержащей Cry1Ab в дозах, сравнимых с концентрацией этого Bt-токсина в пыльце трансгенной кукурузы MON810 [17, 18]. Из-за опасений за судьбу охраняемых и полезных видов насекомых ряд европейских стран (Германия, Венгрия, Австрия, Швеция, Польша, Греция, Румыния) прекратили выращивать Bt-кукурузу.

Площади под инсектицидные Bt-культуры достигли исторического максимума в 28.8 млн га (16% всех трансгенных культур) в 2013 г., и, затем, все последующие годы уменьшались, упав в 2016 г. до уровня в 23.1 га (12% всех трансгенных культур). Судя по развитию рынка Bt-культур в США, где в 2016 г. доля посевов Bt-кукурузы и Bt-хлопчатника дошла до абсолютного исторического минимума в 3 и 4% трансгенных культур соответственно, эта тенденция необратима [19]. Показательно также, что во всем мире происходит сокращение площадей под ГМ-культурами с одним признаком (как инсектицидности, так и гербицидоустойчивости), при этом растут площади под сорта, имеющие вышеназванные признаки состыкованными. Падение производства Bt-культур, очевидно, происходит по причине их экономической неэффективности, возникающей как из-за широко распространяющихся мутаций устойчивости к Bt-токсинам у вредных насекомых [20, 21], так и вследствие всплесков численности вторичных вредителей из отряда Homoptera, нечувствительных к Cry-белкам [22, 23].

Тем не менее, работы по созданию новых Bt-сортов продолжают. Так, в 2012 г. была разрешена к использованию Bt-кукуруза с синтетическим геном *eCry3.1Ab*, кодирующим химерный белок с активными центрами токсинов Cry3A и Cry1Ab, что позволяет ему поражать личинок как Жесткокрылых, так и Чешуекрылых. В конце 2017 г. этот ген использовался уже в 35 сортах ГМ-кукурузы. В ряде этих сортов проявился еще одна тенденция в использовании Bt-токсинов: состыковка вместе нескольких Cry-генов для замедления процесса развития резистентности у вредителей. Так, например, в биотехнологическом сорте кукурузы Agrisure® Duracade™ 5222,

разработанном корпорацией Syngenta, кроме вышеназванного гена *eCry3.1Ab*, имеются синтетические гены *mcry3A* и *cry1Fa2*, а также гены *cry1Ab* и *vip3Aa20* [24].

### VIP-ГЕНЫ

Быстрая эволюция устойчивости с.-х. вредителей к Bt-растениям заставила биотехнологов не только соединять в одном геноме несколько Cry-генов, кодирующих разные инсектицидные белки, но также искать иные биогенные токсины для создания новых ГМ-культур. Можно с известной долей вероятности полагать, что испытывались и продолжают испытываться инсектицидные белки всех известных энтомопатогенных микроорганизмов, однако лишь ГМ-растения с *Vip3Aa*-генами получили разрешение на коммерческое использование. В отличие от  $\delta$ -эндотоксинов, экспрессия которых проходит во время споруляции, синтез Vip-белков (Vegetative insecticidal protein – вегетативные инсектицидные белки) начинается на стадии вегетативного роста *B. thuringiensis* (с середины логарифмической фазы) и продолжается во время стадии споруляции. В настоящее время эти белки выявлены примерно у 15% штаммов *B. thuringiensis*. Известно четыре группы Vip-белков, различающихся своей аминокислотной последовательностью и специфической токсичностью для разных отрядов насекомых. Представители группы Vip1 и Vip2 являются бинарными токсинами и, в большинстве своем, действуют против Жесткокрылых. Только для пары белков Vip1Ae-Vip2Ae выявлено инсектицидное действие на представителя отряда Равнокрылых (Homoptera): хлопковую тлю *Aphis gossypii*. Vip1 и Vip2 первоначально были выделены из штамма *B. cereus* AB78, а затем – из *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* 7. Каждый полипептид в бинарном токсине Vip1/Vip2 функционирует отдельно. Мембраносвязывающий мультимер Vip1 с молекулярной массой 95 кДа обеспечивает путь в цитоплазму для Vip2. Белок 52 кДа Vip2 по своей аминокислотной последовательности и структуре имеет гомологию с ферментативным доменом токсина CdtA *Clostridium difficile* и йота-токсинным доменом Ia *C. perfringens*, обладающих АДФ-рибозилтрансферазной активностью. Эти ферменты разрушают актин, что приводит к нарушению функционирования цитоскелета и, в

конечном итоге, к гибели клеток. Белки группы Vip3 – полипептиды, токсичные для Чешуекрылых. Спектр действия белков группы Vip4 пока не известен [25–28].

Для создания инсектицидных культур пока используется только ген *Vip3Aa* бактерии *B. thuringiensis* штамма АВ88. Белки Vip3A вызывают летальный исход у личинок Чешуекрылых в течение 24–72 ч после попадания в их желудочно-кишечный тракт. Спектр их инсектицидной активности довольно впечатляющий: хлопковые совки (*Spodoptera frugiperda*, *S. exigua*, *Helicoverpa zea*), совка ипсилон *Agrotis ipsilon*, табачная огневка *Heliothis virescens*. Таким образом, список видов Чешуекрылых, гусеницы которых погибают от Vip3A, значительно шире соответствующего показателя для Cry-белков. Прототоксин Vip3A-F [Full-length, полноразмерный] состоит из 791 аминокислоты и “весит” порядка 88.5 кДа. При попадании в желудочно-кишечный тракт гусениц прототоксин, протеолитически активируется и превращается в активный токсин с молекулярным весом 62 кДа. Токсин Vip3A не имеет структурной гомологии с  $\delta$ -эндотоксинами, в частности, у него нет длинной амфипатической спирали в N-концевой части белка (домен 1), которая у Cry-белков ответственна за проникновение через клеточную мембрану. Из этого можно сделать вывод об ином механизме его действия [25].

В лабораторных экспериментах было показано, что прототоксин Vip3A-F активируется при воздействии как трипсина – Vip3A-T [Trypsin], так и экстракта кишечного сока – Vip3A-G [Gut]. Однако белки Vip3A-G, получающиеся в результате протеолитической активации в кишечнике разных видов, могут различаться. Так, токсины, полученные после переваривания кишечным соком восприимчивых к ним гусениц *A. ipsilon* и *S. frugiperda*, оказались менее стабильными. Крайне интересным представляется и то обстоятельство, что прототоксин Vip3A-F активируется кишечным соком как чувствительной к нему гусеницы табачного бражника *Manduca sexta*, так и нечувствительной гусеницы кукурузного мотылька *O. nubilalis* [29]. Из данного обстоятельства можно сделать вывод, что устойчивость разных видов насекомых к этому токсину обусловлена более тонкими молекулярными механизмами, нежели протеолитическая активация.

В экспериментах *in vitro* было показано, что у белка Vip3A-T способность образовывать поры в двухслойной липидной мембране начинается с pH 5.0 и заканчивается при pH 10.0. Максимальный диаметр ионных каналов (1.4 нм) наблюдается при pH 8.0. По мере снижения pH их диаметр также уменьшается [28]. Способность образовывать ионные каналы в отсутствие любых рецепторов подтверждает как имманентное свойство белка Vip3A к образованию пор, так и наличие опреде-

ленных защитных механизмов в кишечнике у насекомых.

Изучение поведения меченого токсина Vip3A в кишечнике гусениц *M. sexta* показало, что происходит его конкурентное связывание с мембранными пузырьками клеток щеточной каймы эпителия средней кишки гусениц. В то время как протеолитическая активация Vip3A в кишечниках гусениц как чувствительных, так и нечувствительных видов насекомых происходит примерно одинаково, *in vivo* иммунолокализация показывает, что молекулы Vip3A прикрепляются к клеткам эпителия кишечника гусениц первых в значительно больших масштабах, нежели к таковым у вторых. Исследования *in vitro* с клетками средней кишки чувствительных гусениц *M. sexta* показали, что, если молекулы активированного токсина Cry1Ab связывались с молекулами 120 кДа аминоклонидазы-N и 250 кДа кадгерина, то молекулы токсина Vip3A-G прикреплялись к 80 и 100 кДа молекулам, отличавшихся от всех известных Cry1Ab рецепторов. Исследования *in vitro* средней кишки гусениц *M. sexta* методом фиксации напряжения показали, что белок Vip3A-G действительно образует поры, в то время как прототоксин Vip3A-F на это не способен. Также поры не образовывались при проведении аналогичных экспериментов с токсином Vip3A-G у нечувствительных к Vip-белкам гусениц *D. plexippus* L. [29].

Токсичность Vip3A на два-три порядка превышает таковую у дельта-эндотоксинов. Так, если LD<sub>50</sub> белков Cry1A(b) и Cry1A(c) для гусениц *A. ipsilon* составляет около 80 и 18 мкг на 1 мл корма соответственно, то 100% смертность особей того же вида достигается при добавлении всего 62 нг Vip3A на 1 мл искусственного корма [25]. Гистологические исследования показали, что нанесение токсина Vip3A на искусственный корм в концентрации 4 нг/см<sup>2</sup> вызывает паралич кишечника у гусениц 1-го возраста *A. ipsilon* и *S. frugiperda*. Применение более высокой дозы – 40 нг/см<sup>2</sup> – вызывает полный лизис клеток эпителия кишечника и гибель гусениц; в то же время личинки кукурузного мотылька (*Ostrinia nubilalis*), нечувствительные к этому токсину, питались кормом, содержащим Vip3A, безо всяких негативных для себя последствий [29, 30].

Первый сорт ГМ-хлопчатника, экспрессирующий токсин Vip3Aa, VipCot, оказался очень эффективен против *Helicoverpa armigera* [31], но не против ряда других вредителей, поэтому в серию не пошел. Сорт VipCot<sup>TM</sup> с двумя состыкованными генами *Cry1Ab* и *Vip3Aa19* защищает не только от *H. armigera*, но и от двух других ключевых вредителей хлопчатника: *H. zea* и *H. virescens* [32]. В настоящее время в США разрешено к использованию одно событие трансформации у кукурузы с

геном *Vip3Aa20* и одно событие трансформации у хлопчатника с геном *Vip3Aa19* [1].

Дальнейшая работа по совершенствованию Vip-хлопчатника идет в направлении обеспечения стабильной экспрессии *Vip3A*-гена на протяжении всего жизненного цикла. Для этих целей был разработан и синтезирован ген *vip3A\** с повышенным содержанием нуклеотидов GC, что позволило добиться большей стабильности соответствующей мРНК. Кроме того, в гене *vip3A\**, как и в случае с оптимизированными для растений *Cry*-генами, микробные кодоны были заменены кодонами высших растений. И, наконец, была создана химерная конструкция *tvip3A\** состоящей из гена *vip3A\** и гена *thi1*, кодирующего транзиторийный белок хлоропласта. Благодаря этой конструкции удалось повысить экспрессию инсектицидного белка и обеспечить его накопление в хлоропластах. Данная экспериментальная линия ГМ-хлопчатника в полевых испытаниях обеспечивала полную защиту от *H. zea*, *S. frugiperda* и *S. exigua* [33].

## R-ГЕНЫ И ДРУГИЕ ГЕНЫ

Наряду с вредными насекомыми огромный экономический вред сельскохозяйственным культурам наносит фитопатогенные микроорганизмы. Так, например, четвертую по значимости и важнейшую сельскохозяйственную культуру среди незерновых — картофель (*S. tuberosum* L.) — по всему земному шару преследует фитопатогенный оомицет *Phytophthora infestans* Mont. De Byar. Вызываемая им болезнь фитофтороз приводит иногда к потерям 100% урожая и наносит многомиллиардные убытки. В 2009 г. у аргентинского вида дикого картофеля *S. venturii* был открыт (идентифицирован и клонирован) ранее неизвестный ген устойчивости к фитофторозу *Rpi-vnt1.1*, относящийся к так называемым R-генам. Ген *Rpi-vnt1.1* локализован в 9 хромосоме, и его доминантная аллель обеспечивает своему носителю специфическую резистентность к этому оомицету. Ген кодирует богатый лейцином суперспирализованный нуклеотид-связывающий белок Vnt1, более чем на 75% гомологичный белку Tm-22 помидора *S. lycopersicum*, который придает последнему устойчивость к вирусу мозаики томатов (ToMV). Из 11 протестированных штаммов *P. infestans* только один (ЕС1), выделенный в Эквадоре, смог “пробить” защиту *Rpi-vnt1.1* и вызвать заболевание у искусственно инфицированных растений. Аллели *Rpi-vnt1.1* (*Rpi-vnt1.2* и *Rpi-vnt1.3*), которые отличаются лишь несколькими нуклеотидами, были обнаружены в других устойчивых к фитофторозу линиях *S. venturii*. Позднее, у другого вида дикого картофеля — *S. phureja* — был обнаружен ген *Rpi-phul*, идентичный *Rpi-vnt1*. Однако не ясно, унаследовали ли эти виды ген от общего предка или какое-то время назад между ними произошел генетический обмен [34].

В 2017 г. ЕРА зарегистрировало ГМ-картофель с активным ингредиентом — белком Vnt1 и генетическим материалом, необходимым для его синтеза, разработанный биотехнологической фирмой J.R. Simplot Co [1]. Интересно, что это была первая культура среди ГМ-растений со встроенной системой защиты, которая, согласно классификации ГМО, предложенной Kaare M. Nielsen [35], относится к категории “фамигенных” (генетическая модификация осуществлена геном организма, принадлежащего тому же семейству, что и реципиент). Однако, если быть до конца последовательными в использовании названной классификации, данное событие трансформации, как и все другие с использованием агробактериальных векторов, следует рассматривать, как трансгенное (генетическая модификация осуществлена геном организма неродственного реципиенту).

С 2012 г. в Австралии проходят испытания две ГМ-линии триплоидного банана *Musa acuminata* (сорт Кавендиш), устойчивые к TR4 (тропической расе 4) анаморфного плесневого гриба *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* Foc, вызывающего у бананового “дерева” так называемую “Панамскую болезнь” или сосудистое увядание. Одна линия трансформирована R-геном *RGA2*, выделенным из TR4-резистентного диплоидного банана *M. acuminata ssp. malaccensis*, вторая — геном анти-апоптоза *Ced9*, полученным из нематод *Caenorhabditis elegans* [36]. В случае получения разрешения на промышленное использование, сорт банана с геном круглого червя станет первым ГМ-растением, трансформированным геном животного.

## РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

Наряду с быстрой эволюцией устойчивости вредителей к Bt-токсинам, встроенная защита, основанная на *Cry*- и *Vip*-генах, имеет еще один существенный недостаток: она не служит препятствием для вредителей из отрядов Diptera и Hymenoptera, не говоря уже о фитопатогенных организмах, не относящихся к царству Животных. Именно по этой причине параллельно с поиском инсектицидных белков и кодирующих их генов биотехнологи ищут более универсальные механизмы для создания встроенных систем защиты. Так, сразу же после открытия в 1998 г. РНК-интерференции, ее стали рассматривать как перспективный метод для защиты сельскохозяйственных культур от вредителей, в особенности от тех, с которыми не могут справиться Bt-растения. РНК-интерференция представляет собой регуляторный механизм, который контролирует уровень содержания матричной РНК (мРНК) двумя путями: либо подавлением транскрипции (транскрипционное выключение генов или TGS), либо путем активации процесса деградации мРНК на основе гомологии

(посттранскрипционное выключение генов или PTGS). Последний путь (PTGS) включает в себя продуцирование двухцепочечной РНК (дцРНК), представляющую собой РНК-копию гена-мишени. Последняя, затем, нарезается ферментом РНКазой III и/или его гомологами на РНК-дуплексы или малые интерферирующие РНК (миРНК), состоящие из 21–24 нуклеотидных пар. Эти миРНК далее присоединяются к мультисубъединичному эндонуклеазному комплексу выключения RISC (RNA-induced silencing complex – РНК-индуцируемому комплексу выключения). Белок Argonaute, основной каталитический компонент RISC, использует миРНК в качестве руководства для распознавания и дегградации комплементарной ей мРНК [37].

Парадоксально, но впервые возможность использования РНК-интерференции для защиты растений была продемонстрирована в середине 1980-х годов, когда еще само явление не было открыто. Выяснилось, что трансформация растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) геном, кодирующим белок оболочки вируса табачной мозаики, делала их устойчивыми к этому вирусу [38]. Хотя механизм резистентности данных генно-инженерных растений до открытия РНК-интерференции не был понятен, практические работы по внедрению обнаруженного явления почти сразу же начались на ряде с.-х. культур.

Одним из первых биотехнологических растений со встроенной системой защиты, основанной на обнаруженном и еще не совсем понятном механизме, стал картофель со встроенным геном *Orf1/Orf2* вируса скручивания листьев картофеля. Этот сорт ГМ-картофеля получил разрешение на использование в 1998 г., однако до потребителя до сих пор не дошел. Такая же судьба постигла и ГМ-сливу с геном белка оболочки вируса скрытой мозаики (“оспы”) сливы. Тем не менее, несколько биотехнологических культур с данной системой защиты нашли применение (хотя и на небольших площадях): в США высеваются ГМ-сорта тыквы, а на Гавайях – ГМ-сорт папайи, устойчивые к вирусам скрытой мозаики и кольцевой пятнистости, соответственно; кроме того, в Китае высеиваются устойчивые к вирусным заболеваниям ГМ-сорта сладкого перца и помидора [2].

Главная проблема в использовании метода РНК-интерференции для борьбы с вредными насекомыми заключается в отсутствие у них RdRp (РНК-зависимой РНК-полимеразы), что делает невозможным амплификацию дцРНК. По этой причине в организме насекомого дцРНК должна поступать непрерывно и в достаточном количестве. В противном случае замолкание гена может быть либо неполным, либо временным и, соответственно, не приводить к летальному исходу [39].

Соответственно, и синтез дцРНК в ГМ-растениях должен постоянно находиться на высоком уровне.

Успех РНК-интерференции в защите растений в первую очередь зависит от подбора подходящих генов-мишеней. Было идентифицировано и описано несколько ферментов и белков насекомых, гены которых могут быть хорошими мишенями для выключения. Экспрессия большинства таких генов происходит в эпителии средней кишки насекомых, поскольку этот орган считается наиболее удобным для доставки дцРНК. Это связано с тем, что тело насекомых покрыто хитиновым экзоскелетом, от которого свободна лишь средняя кишка – практически единственный орган насекомого, клетки которого имеют непосредственный контакт с внешней средой. Именно клетки эпителия средней кишки поглощают воду, питательные и другие вещества из просвета кишечника, и поэтому могут служить магистральным путем поступления дцРНК в организм насекомых. Одним из первых опытов в этом направлении стало кормление личинок хлопкового коробочного червя *H. armigera* госсиполом и листьями модельных ГМ-растений *Arabidopsis thaliana* и *N. tabacum*, синтезирующих дцРНК гена *CYP6AE14*, кодирующего одну из цитохром Р450-зависимых монооксигеназ. Результатом этих экспериментов стало существенное замедление личиночного развития и сокращение количества транскриптов названного гена в средней кишке [40]. Полученный эффект объясняется тем, что именно повышенный уровень экспрессии гена *CYP6AE14* позволяет личинкам *H. armigera*, в отличие от других вредителей, питаться тканями хлопчатника, содержащими этот токсичный терпеноид в значительном количестве.

Буряя рисовая цикадка *Nilaparvata lugens* Stål (Hemiptera: Delphacidae) считается одним из самых опасных вредителей риса. *N. lugens* наносит серьезный урон данным растениям, во-первых, непосредственно высасывая сок флоэмы, и, во-вторых, являясь носителем вируса карликовости риса. При создании нескольких линий трансгенных растений в качестве мишеней для замолкания были выбраны гены, экспрессия которых происходит в средней кишке *N. lugens*: *NIHT1* (трансмембранный белок-транспортер глюкозы), *Nlcar* (карбоксипептидаза) и *Nltry* (трипсиноподобная сериновая протеаза). Опыты с нимфами 3 возраста показали, что снижение экспрессии целевых генов (на 40–50%) происходит на 2 день кормления ГМ-рисом, а максимум (на 70%) – на 4 день [41].

Исследования на модельном объекте – табаке обыкновенном *N. tabacum* – показали, что дцРНК ГМ-растений может эффективно подавлять экспрессию генов и в других органах насекомых. В качестве мишени у хлопкового коробочного червя (*H. armigera*) был выбран ген *HaHR3*

(фактор транскрипции, регулирующий линьку). Когда личинок *H. armigera* кормили ГМ-растениями *N. tabacum*, синтезирующими соответствующую дцРНК, уровни мРНК и белка NaHR3 у них резко понижались, что приводило в конечном итоге к нарушению развития и гибели [42]. Очень остроумен пример развития гена *CYP6B46* у табачного бражника *M. sexta* с помощью еще одной цитохром P450-зависимой монооксигеназы. Благодаря названному гену, гусеницы способны переносить высокие концентрации нейротоксина никотина в кормовом растении *N. attenuata*. Гусеницы выдыхают никотин через дыхальца, отпугивая тем самым хищного паука-волка (тарантула) *Camptocosa parallela* (Lycosidae). Растения *N. attenuata* трансформировали конструкцией, кодирующей дцРНК, соответствующей 300 нуклеотидным парам гена *CYP6B46* табачного бражника. В результате гусеницы *M. sexta*, потребляющие этот ГМ-табак, стали выдыхать меньше никотина и перестали отпугивать тарантулов, чем последние, соответственно, воспользовались [43].

Сотрудниками фирмы Монсанто были сконструированы две линии ГМ-кукурузы, синтезирующие дцРНК гена  $\alpha$ -тубулина и дцРНК гена  $H^+$ -АТФазы западного кукурузного жука *D. virgifera virgifera*. В опытах с использованием камеры искусственного климата было показано сниженное, по сравнению с контролем, повреждение корней растений обеих линий личинками данного вредителя [44]. Однако более эффективным в борьбе с *D. virgifera* оказалась ГМ-линия кукурузы MON 87411 с генами дцРНК *DvSnf7* и *Cry3Bb1*. Ген *DvSnf7* кодирует белок, входящий в ESCRT (The endosomal sorting complexes required for transport – гетеро-олигомерный комплекс эндосомальной сортировки). ESCRT катализирует топологически сходные процессы ремоделирования клеточных мембран, заключающиеся в превращении мембранных впячиваний в ранние эндосомы. Через 24 часа после начала питания растениями обеих линий у личинок жука происходит замолкание гена *DvSnf7* (останавливается синтез соответствующей мРНК), затем прекращается синтез белка *DvSnf7* и через пять дней наступает гибель. После почти десяти лет испытаний и тестирования на нецелевых объектах, ГМ-линия кукурузы MON 87411 была признана безопасной, и в 2015 г. она получила разрешение на свободное использование [1].

Биотехнологии, основанные на пероральном поступлении дцРНК насекомых (в том числе ГМ-растений) применимы, однако, не ко всем группам вредителей. Так, например, пустынная саранча *Schistocerca gregaria* (Orthoptera) очень восприимчива к дцРНК, вводимой в гемоцель, но не к дцРНК, попадающей в пищеварительный тракт. Это во многом связано с высокой активностью дцРНК-специфичных рибонуклеаз (dsRNases) в ее

средней кишке. В целом насекомые демонстрируют довольно широкий спектр чувствительности к дцРНК, поступающей в их организм пероральным путем. Самыми чувствительными, по сравнению с представителями других отрядов, оказались Жесткокрылые (Coleoptera). Чувствительным к дцРНК подвержена сильной изменчивости, однако эффект замолкания генов происходит у них в случае поступления в среднюю кишку дцРНК в количестве на два порядка больше по сравнению с жуками [45].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка ГМ-растений со встроенной системой защиты от вредителей стала одним из главных направлений сельскохозяйственной биотехнологии. С середины 90-х годов XX века до настоящего времени абсолютное большинство этих трансгенных культур представлено сортами, несущими инсектицидные гены бактерии *B. thuringiensis*. Однако в последнее десятилетие в мире наблюдается тенденция к переходу на использование для защиты от вредных насекомых и фитопатогенных вирусов встроенных систем защиты, основанных на механизме РНК-интерференции.

С начала второй половины XX века теоретики и практики в области защиты растений ведут дискуссию о возможности создания сельскохозяйственных культур, устойчивых к фитофагам и фитопатогенным организмам. С каждым витком развития сельскохозяйственных биотехнологий эта дискуссия, обогащаясь новыми фактами *pro* и *contra*, поднимается на новый уровень, не всегда учитывая все факты *contra*. Так и сейчас, создатели дцРНК ГМ-растений считают, что вредные насекомые не смогут стать устойчивыми к этим культурам, так как механизм РНК-интерференции лежит в основе жизнедеятельности каждой эукариотической клетки. Однако нам представляется, что эволюционный ответ вредителей может иметь несимметричный характер. Естественный отбор будет благоприятствовать мутациям как повышающим активность дцРНК-специфичных рибонуклеаз в пищеварительном тракте и гемолимфе, так и мутациям, уменьшающим поглощение дцРНК апикальными частями клеток средней кишки. Поэтому, мы полагаем, что расы *D. virgifera*, устойчивые к MON87411, появятся примерно через 20 поколений (как и у всех других вредных насекомых, вырабатывавших устойчивость к инсектицидам) после начала использования этих ГМ-растений.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Current and Previously Registered Section 3 Plant-Incorporated Protectant (PIP) Registrations // EPA.



2017. <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/current-and-previously-registered-section-3-plant-incorporated>.
2. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016 // ISAAA Briefs. Brief 52. <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/52/download/isaaa-brief-52-2016.pdf>.
  3. *Kreuze J.F., Valkonen J.P.* Utilization of engineered resistance to viruses in crops of the developing world, with emphasis on sub-Saharan Africa // *Curr. Opin. Virol.* 2017. V. 26. P. 90–97.
  4. Codon usage database: <http://www.kazusa.or.jp/codon/>.
  5. *Perlak F.J., Fuchs R.L., Dean D.A., Mcpherson S.L., Fischhoff D.A.* Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. P. 3324–3328.
  6. *Tabashnik B.E., Gould F., Carrière Y.* Delaying evolution of insect resistance to transgenic crops by decreasing dominance and heritability // *J. Evol. Biol.* 2004. V. 17. P. 904–912.
  7. *Gassmann A.J.* Field-evolved resistance to Bt maize by western corn rootworm: predictions from the laboratory and effects in the field // *J. Invertebr. Pathol.* 2012. V. 110. P. 287–293.
  8. *Andow D.A., Pueppke S.G., Schaafsma A.W., Gassmann A.J., Sappington T.W., Meinke L.J., Mitchell P.D., Hurley T.M., Hellmich R.L., Porter R.P.* Early detection and mitigation of resistance to Bt maize by western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) // *J. Econ. Entomol.* 2016. V. 109. P. 1–12.
  9. *Gassmann A.J.* Resistance to Bt maize by western corn rootworm: insights from the laboratory and the field // *Insect Science.* 2016. V. 15. P. 111–115.
  10. *Hellmich R.L., Siegfried B.D., Sears M.K., Stanley-Horn D.E., Daniels M.J., Mattila H.R., Spencer T., Bidne K.G., Lewis P.* Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis* purified proteins and pollen // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 11925–11930.
  11. *Darvas B., Csóti A., Gharib A., Peregovits L., Ronkay L., Lauber É., Polgár L.A.* Data for the risk analysis in Hungary of Bt maize pollen and larvae of protected butterfly species // *Növényvédelem.* 2004. V. 40. P. 441–449.
  12. *Hofmann F., Epp R., Kalchschmid A., Kratz W., Kruse L., Kuhn U., Maisch B., Müller E., Ober S., Radtke J., Schlechtriemen U., Schmidt G., Schröder W., Ohe W. v. d., Vögel R., Wedl N., Wosniok W.* Monitoring of Bt-Maize Pollen Exposure in the Vicinity of the Nature Reserve Ruhlsdorfer Bruch in Northeast Germany 2007 to 2008 // *Umweltwiss. Schadst. Forsch.* 2010. V. 22. P. 229–251.
  13. *Hofmann F., Otto M., Wosniok W.* Maize pollen deposition in relation to distance from the nearest pollen source under common cultivation – results of 10 years of monitoring (2001 to 2010) // *Environmental Sciences Europe.* 2014. V. 26. P. 24.
  14. *Saxena D., Flores S., Stotzky G.* Vertical movement in soil of insecticidal Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis* // *Soil Biology and Biochemistry.* 2002. V. 34. P. 111–120.
  15. *van Frankenhuyzen K.* Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins // *Journal of Invertebrate Pathology.* 2013. V. 114. P. 76–85.
  16. *Bai Y.Y., Jiang M.X., Cheng J.A.* Effects of transgenic cry1Ab rice pollen on fitness of *Propylaea japonica* (Thunberg) // *J. Pest. Sci.* 2005. V. 78. P. 123–128.
  17. *Schmidt J.E.U., Braun C.U., Whitehouse L.P., Hilbeck A.* Effects of activated Bt transgene products (Cry1Ab, Cry3Bb) on immature stages of the ladybird *Adalia bipunctata* in laboratory ecotoxicity testing // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2009. V. 56. P. 221–228.
  18. *Hilbeck A., McMillan J.M., Meier M., Humbel A., Schlaepfer-Miller J., Trtikova M.* A controversy re-visited: is the coccinellid *Adalia bipunctata* adversely affected by Bt toxins? // *Environ. Sci. Eur.* 2012. V. 24:10.
  19. *Fernandez-Cornejo J., Wechsler S.J.* Recent Trends in GE Adoption // United States Department of Agriculture Economic Research Services. 2014. Retrieved from [http://www.ers.usda.gov/webdocs/DataFiles/Adoption\\_of\\_Genetically\\_Engineered\\_Crops\\_in\\_the\\_US\\_\\_17963/alltablesGECrops.csv](http://www.ers.usda.gov/webdocs/DataFiles/Adoption_of_Genetically_Engineered_Crops_in_the_US__17963/alltablesGECrops.csv).
  20. *Zhang H., Wen T., Zhao J., Jin L., Yang J., Liu C., Yang Y., Wu S., Wu K., Cui J., Tabashnik B.E., Wu Y.* Diverse genetic basis of field-evolved resistance to Bt cotton in cotton bollworm from China // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. 10275–10280.
  21. *Gassmann A.J., Petzold-Maxwell J.L., Clifton E.H., Dunbar M.W., Hoffmann A.M., Ingber D.A., Keweshan R.S.* Field-evolved resistance by western corn rootworm to multiple *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic maize // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. P. 5141–5146.
  22. *Lu Y., Wu K., Jiang Y., Xia B., Li P., Feng H., Wyckhuys K.A.G., Guo Y.* Mirid bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption of Bt cotton in China // *Science.* 2010. V. 328. P. 1151–1154.
  23. *Catarino R., Ceddia G., Areal F. J., Park J.* The impact of secondary pests on *Bacillus thuringiensis* (Bt) crops // *Plant Biotechnol. J.* 2015. V. 13. P. 601–612.
  24. Event Name: 5307 × MIR604 × Bt11 × TC1507 × GA21 × MIR162 // <http://www.isaaa.org/gmaprovaldatabase/event/default.asp?EventID=331>.
  25. *Estruch J.J., Warren G.W., Mullins M.A., Nye G.J., Craig J.A., Koziel M.G.* Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects // *PNAS.* 1996. V. 93. P. 5389–5394.
  26. *Sattar S., Maiti M.K.* Molecular characterization of a novel vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* effective against sap-sucking insect pest // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2011. V. 21. P. 937–946.
  27. *Palma L., Muñoz D., Berry C., Murillo J., Caballero P.* *Bacillus thuringiensis* Toxins: an overview of their bio-cidal activity // *Toxins.* 2014. V. 6. P. 3296–3325.
  28. *Kunthic T., Watanabe H., Kawano R., Tanaka Y., Promdonkoy B., Yao M., Boonserm P.* pH regulates pore formation of a protease activated Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis* // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.* 2017. V. 1859. P. 2234–2241.
  29. *Lee M.K., Walters F.S., Hart H., Palekar N., Chen J.* The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of

- Cry1Ab d-endotoxin // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 4648–4657.
30. Nelson K.L., Brodsky R.A., Buckley J.T. Channels formed by subnanomolar concentrations of the toxin aerolysin trigger apoptosis of T-lymphomas. // Cell Microbio. 1999. V. 1. P. 69–74.
  31. Llewellyn D.J., Mares C.L., Fitt G.P. Field performance and seasonal changes in the efficacy against *Helicoverpa armigera* (Hübner) of transgenic cotton expressing the insecticidal protein Vip3A // Agric. Forest Entomol. 2007. V. 9. P. 93–101.
  32. Kurtz R.W., McCaffery A., O'Reilly D. Insect resistance management for Syngenta's VipCot™ transgenic cotton // J. Invertebr. Pathol. 2007. V. 95. P. 227–230.
  33. Wu J., Luo X., Zhang X., Shi Y., Tian Y. Development of insect-resistant transgenic cotton with chimeric TVip3A\* accumulating in chloroplasts // Transgenic Res. 2011. V. 20. P. 963–973.
  34. Foster S.J., Park T-H., Pel M.A., Brigneti G., Śliwka J., Jagger L., Vossen E.A.G., Jones J.D.G. *Rpi-vnt1.1*, a *Tm-2<sup>2</sup>* homolog from *Solanum venturii*, confers resistance to potato late blight // Mol. Plant Microbe Interact. 2009. V. 22. P. 589–600.
  35. Nielsen K.M. Transgenic organisms: time for conceptual diversification? // Nature Biotechnology. 2003. V. 21. P. 227–228.
  36. Dale J., James A., Paul J.-Y., Khanna H., Smith M., Peraza-Echeverria S., Garcia-Bastidas F., Kema G., Waterhouse P., Mengersen K., Harding R. Transgenic Cavendish bananas with resistance to Fusarium wilt tropical race 4 // Nature Communications. 2017. V. 8. P. 1496.
  37. Fire A.Z. Gene silencing by double-stranded RNA // Cell Death and Differentiation. 2007. V. 14. P. 1998–2012.
  38. Abel P.P., Nelson R.S., De B., Hoffmann N., Rogers S.G., Fraley R.T., Beachy R.N. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene // Science. 1986. V. 232. P. 738–743.
  39. Price D.R., Gatehouse J.A. RNAi-mediated crop protection against insects // Trends Biotechnol. 2008. V. 26. P. 393–400.
  40. Mao Y.B., Cai W.J., Wang J.W., Hong G.J., Tao X.Y., Wang L.J., Huang, Y.P., Chen X.Y. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol // Nature Biotech. 2007. V. 25. P. 1307–1313.
  41. Zha W., Peng X., Chen R., Du B., Zhu L., He G. Knock-down of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-mediated RNA interference in the Hemipteran insect *Nilaparvata lugens* // PLoS ONE. 2011. V. 6. P. e20504.
  42. Xiong Y., Zeng H., Zhang Y., Xu D., Qiu D. Silencing the *HaHR3* gene by transgenic plant-mediated RNAi to disrupt *Helicoverpa armigera* development // Int. J. Biol. Sci. 2013. V. 9. P. 370–381.
  43. Kumar P., Pandit S.S., Steppuhn A., Baldwin I.T. Natural history-driven, plant-mediated RNAi-based study reveals CYP6B46's role in a nicotine-mediated anti-predator herbivore defense // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. P. 1245–1252.
  44. Baum J.A., Bogaert T., Clinton W., Heck G.R., Feldmann P., Ilagan O., Johnson S., Plaetinck G., Munyikwa T., Pleau M., Vaughn T., Roberts J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference // Nat. Biotechnol. 2007. V. 25. P. 1322–1326.
  45. Prentice K., Christiaens O., Pertry I., Bailey A., Niblett C., Ghislain M., Gheysen G., Smagghe G. RNAi-based gene silencing through dsRNA injection or ingestion against the African sweet potato weevil *Cylas puncticolis* (Coleoptera: Brentidae) // Pest. Manag. Sci. 2017. V. 73. P. 44–52.