ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ, 2021, том 68, № 4, с. 356–370

ОБЗОРЫ

УДК :581.1.577.218

РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ В ЗАЩИТНЫХ СИСТЕМАХ РАСТЕНИЙ

© 2021 г. И. В. Максимов[a], *, М. Ю. Шеин[a], Г. Ф. Бурханова[a]

[a] Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Уфа, Россия

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

Поступила в редакцию 27.08.2020 г.
После доработки 29.09.2020 г.
Принята к публикации 02.10.2020 г.

Вредители и патогены, в том числе и вирусы, ограничивают биологический потенциал сельскохозяйственных растений, что представляет огромную угрозу продовольственной безопасности. 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). Он формирует один из “эшелонов” одновременно эволюционно консервативного и высоко видоспецифичного фитоиммунитета. В обзоре обсуждается роль малых некодирующих РНК и белков DCL, AGO и RDR, вовлеченных в механизм РНКи, в инфицировании фитопатогенами, вирусами, вредителями и перспективы использования этого феномена при создании препаратов для защиты растений от болезней и вредителей, в том числе с применением метода искусственного отключения генов, описываемого как спрей-индуцированный генный сайленсинг (СИГС, spray induced gene silencing, SIGS).

Ключевые слова: РНК-интерференция, фитоиммунитет, DCL, AGO, RDR

DOI: 10.31857/S0015330321030131

ВВЕДЕНИЕ

РНК-интерференция (РНКи) – одно из выдающихся открытий в биологии, документально подтвержденное в 1998 г. Э. Файром и К. Меллоу с использованием в качестве объекта исследований нематоды *Caenorhabditis elegans* [1]. Механизм РНКи присутствует практически у всех живых организмов и управляет активностью генов посредством формирования коротких двуцепочечных РНК (дцРНК) и синтеза специальных рибонуклеаз (РНКаз), индуцирующих селективную деградацию целевых РНК (вирусных, информационных, транспозонных) и/или ингибирование их трансляции или репликации. На первом этапе целевые дцРНК синтезируются РНК-зависимыми РНК полимеразами (RNA-dependent RNA polymerase, RdR) из исходной одноцепочечной молекулы РНК (вирусная или информационная РНК, транскрибированная с ДНК и кодирующая тот или иной целевой белок, или РНК, транскрибированные с ДНК транспозона и пре-микроРНК, содержащие специфические “шпилечные” структуры).

Функция RdR в защите растений от вирусов состоит в образовании репликативной вирусной дцРНК, которая, взаимодействуя с белками DCL, индуцирует свою специфическую деградацию [2]. Низкий уровень экспрессии *StRdR* в растениях картофеля *Solanum tuberosum* сопровождался накоплением вируса картофеля Y [3]. Точно так же, в мутантных по гену *rdr1* растениях табака *Nicotiana benthamiana* многократно повышался титр вирусов и, соответственно, снижалась вирусоустойчивость [4], а растения, трансгенные по гену *MtRdR1* от люцерны *Medicago truncatula,* были устойчивы к вирусу табачной мозаики [4]. Вместе с тем есть данные, что подавление экспрессии гена *StRdR1* значительно не влияло на устойчивость растений картофеля *S. tuberosum* к вирусам X и Y [5].

Уровень транскриптов гена *AtRdR1* был выше в растениях *A. thaliana,* предварительно обработанных салициловой кислотой (СК), тогда как ген *AtRdR2* не был чувствителен к ней [4]. Ген *StRdR1*

Сокращения: РНКи – РНК-интерференция; дцРНК – двуцепочечные РНК (double-strand RNA, dsRNA); оцРНК – одноцепочечные РНК (single-strand RNA, ssRNA); siRNA – короткие интерферирующие РНК (small interference RNA); ta-siRNA – влияющие на транскрипцию siRNA (trans-acting siRNA); ВП-siRNA – вирус-производные (virus-derived) siRNA; RdDM – РНК-зависимые ДНК-метилазы (RNA-directed DNA metilase,), RISC – RNA-induced silencing complex; RITS – RNA-induced transcriptional silencing complex; ВТМ – вирус табачной мозаики; YВК – Y вирус картофеля; ВОМ – вирус огуречной мозаики; ХИГС – хозяин-индуцированный генный сайленсинг; СИГС – спрей-индуцированный генный сайленсинг; СПУ – системная приобретенная устойчивость; нт – нуклеотидные остатки.

S. tuberosum показал высокую чувствительность к СК [5]. В растениях перца *Capsicum annum* экспрессия гена *CaRdR1* стимулировалась под влиянием СК, абсцизовой кислоты (АБК), пероксида водорода (H_2O_2) и инфицирования ВТМ, а его глушение индуцировало в растениях восприимчивость к вирусу [6]. Совместная обработка ВТМ и СК растений томатов *Solanum lycopersicum* способствовала накоплению в них транскриптов *SlRdR1* и *SlRdR2* [7]. Точно также, обработанные СК трансгенные растения табака *N. benthamiana,* накапливающие белок MtRdR1, обладали устойчивостью к ВТМ [4]. Анализ *in silico* промоторной части генов семейства *RdR1-6* различных видов растений показал, что основными их транскрипционными факторами являлись белки MYB44, AS1/AS2 и WRKY1 [8]. Подавление экспрессии *NaRdR1*, *NaRdR2*, но не *NaRdR3* повышало восприимчивость растений табака *Nicotiana attenuata* к грибу *F. brachygibbosum* [9].

Белок RdR6 вовлечен в систему вирусоустойчивости. Так, линии табака, экспрессирующие ген *RdR6*, были устойчивы к YBK, а линии риса *Oryza sativa* с подавленной экспрессией этого гена, напротив, восприимчивы к вирусам китайской полосатой мозаики пшеницы, карликовости риса и полосатой хлоротичности риса [10]. В дефицитных по СК растениях табака *N. benthamiana* NIbV3 NahG, а также двойных мутантах NIbV3 NahG/RdR6i, наблюдался высокий уровень транскриптов генов потивируса шарки сливы, что говорит о важности этой сигнальной молекулы, а также продукта гена *RdR6* в защите растений от вирусной инфекции [11]. Обнаружено, что с белком RdR6 связан механизм замалчивания экспрессии генов, кодирующих рецепторные Tull-подобные нуклеотид-связывающие лейцин-богатые белки (nucleotide binding leucine rich repeat, NB-LRR), а также ряда PR-белков, срабатывание механизма, запускаемого патогеном (pathogen-triggered immunity, PTI) и/или элиситором иммунитета (effector-triggered immunity, ETI) посредством генерации влияющих на транскрипцию siRNA (ta-siRNA, trans-acting siRNA) и устойчивости к бактериальной инфекции [12]. Белок RdR6 запускает РНК-зависимое ДНК-метилирование в транскрибируемых регионах ДНК транспозонов, и приводит к эпигенетическому замалчиванию целевых генов, чего RdR2 не может осуществить. Нокаут- мутанты по гену *rdr6 S. lycopersicum* и *A. thaliana* были восприимчивы к бактериям *Pseudomonas syringae* и *Xanthomonas oryzae,* соответственно [13]. Выявлено, что белок RdR6 накапливается в растениях под влиянием эффектора avrRpt2 бактерии *P. syringae.* С его участием образуются длинноцепочечные siRNA-1 (bacterial-induced siRNA-1) и ассоциированный с siRNA естественный антисмысловой транскрипт (NAT) (natural antisense transcript (NAT)-associated siRNAs), являющийся одним из ключевых в регуляции устойчивости растений к бактериальной инфекции.

Далее, длинные дцРНК, синтезированные RdR, узнаются рибонуклеазами III-го класса, называющимися Dicer- (у позвоночных животных) или Dicer-подобные (Dicer-like, DCL) белки (у растений, грибов и низших беспозвоночных животных), и разрезаются на короткие дцРНК (20–25 нт). DCL белки растений – это многодоменное семейство РНКаз III класса (RNaseIII), инициирующее процессинг дцРНК [3]. Косвенным подтверждением участия белков DCL в иммунитете растений и общей фитофизиологии может служить их разнообразие и нежизнеспособность линий растений, нокаут-мутантных по белку DCL, в особенности DCL1. Предполагается, что современное многообразие этой группы белков в растениях, состоящее из четырех типов белков DCL (*A. thaliana*), эволюционировало в связи с необходимостью развития фитозащитных систем от различных вирусов, патогенов и вредителей [14].

Имеются данные о роли DCL в обеспечении устойчивости растений к вирусным патогенам, защите от транспозонов, супрессии амплификации вирусов/вироидов, регуляции экспрессии собственных генов, репрессии трансгенов [14], что позволяет использовать их в трансгенозе для придания растениям устойчивости к вирусам/вироидам. Показана дифференциальная последовательная активация генов *VvDCL1* и *VvDCL3* у винограда *Vitis vinifera* L. при грибном патогенезе [15]. Если белок DCL4 запускал локальную РНКи, то для системного развития защитного ответа необходимо было сочетание продуктов экспрессии генов и *DCL2,* и *DCL4* [16]. Вместе с тем, при обработке СК мутантные по генам *Atdcl2*, *Atdcl3* и *Atdcl4* растения *A. thaliana* не становились устойчивыми к вирусу огуречной мозаики (ВОМ) и вирусу табачной мозаики (ВТМ) [17]. Тем не менее, обработка СК растений томатов *S. lycopersicum* и последующее их инфицирование ВТМ способствовало накоплению белков DCL1 и DCL2 [18]. Подавление экспрессии *NaDCL3*, но не *NaDCL2/4*, усиливало восприимчивость *N. attenuata* к грибу *Fusarium brachygibbosum* [9]. В противовирусной защите растений белки DCL4 опосредуют подавление репликации вирусной РНК [3, 19]. Показано, что в ходе эволюции механизмов РНКи происходило усиление сродства к вирусной РНК именно белков DCL4 в сравнении с другими DCL [19].

Особую роль в РНКи играют белки Argonaute (AGO), представляющие один из основных каталитических компонентов РНК-индуцируемого комплекса выключения генов (RNA-induced silencing complex, RISC), а также РНК-индуцируемого транскрипционного сайленсинга (RNA-induced transcriptional silencing complex, RITS), обеспечивая протекание, соответственно, пост-транскрипци-

онного (PTGS, post-transcriptional gene silencing) и транскрипционного (TGS, transcriptional gene silencing) замолкания генов [20].

Основная функция белков AGO в растениях – связывание siRNA и miRNA, генерируемых с участием DCL белков, а также их использование в качестве “направляющего” при узнавании и последующем расщеплении РНК генов-мишеней на транскрипционном, пост-транскрипционном и трансляционном уровнях. Антивирусные свойства растительных белков AGO обобщены в обзорной работе Carbonell и Carrington [21]. Продукты генов *AtAGO1*, *AtAGO2*, и *AtAGO7 A. thaliana* вовлечены в вирусоустойчивость [16, 22]. Показано активное участие белков AGO1 и AGO7 в защите турнепса *Brassica rapa* subsp. *rapifera* от вируса морщинистости листьев [23]. Белок NbAGO2 в растениях *N. benthamiana* – важный компонент, придающий устойчивость к вирусам кольцевой пятнистости [24], кустистой карликовости [25] и мозаики томатов [26]. Белки AGO2 *A. thaliana* были более эффективны против X вируса картофеля в сравнении с аналогичным геном из растений *N. benthamiana* [27]. Показана важность белка AGO4 в устойчивости растений к BOM и PVX, а мутанты по гену *ago4* оказывались, кроме того, восприимчивыми к вирусу погремковости табака и вирусу скручивания листьев свеклы [28]. Точно также белок AGO4 оказался важным в формировании защитной системы у растений *N. attenuata* к грибу *F. brachygibbosum*, а замалчивание его синтеза нарушало работу жасмонатной сигнальной системы [9]. Обнаружено, что такое нарушение происходит вследствие отключения синтеза жасмоновой кислоты (ЖК) и устойчивость растений к грибу восстанавливается после обработки растений ЖК.

Белки AGO1 позиционируются как “первый эшелон” защиты, подвергающийся воздействию вирусных супрессоров, а белки AGO2 как следующая линия, нарушающая накопление вируса и находящаяся под совместным контролем белка AGO1 и miR403 [29]. Функции белка AGO2 могут быть исполнены белком AGO5 при нарушении синтеза. Но двойной мутант *ago2ago5* проявлял большую восприимчивость к вирусам по сравнению с мутантами *ago2* или *ago5* по отдельности [27]. В инфицированных вирусом курчавости риса растениях *O. sativa*, помимо транскриптов генов *OsAGO1* и *OsAGO3*, наблюдалось накопление транскрипта гена *OsAGO18*. Предполагается, что кодируемый данным геном продукт играет важную роль в вирусоустойчивости и способствует эффективной экспрессии гена *OsAGO1* [30]. Белок AGO4 – необходимый компонент РНК-связанного ДНК-метилирования при формировании устойчивости *S. lycopersicum* к штамму бактерии *P. syringae* DC3000 [31].

Выявлена важная роль miR403a в процессе индуцированного СК накопления транскриптов гена *NbAGO2* [26]. Показано, что белки AGO2 вместе с miR393b необходимы для регуляции устойчивости растений *A. thaliana* к бактерии *P. syringae* pv. *tomato*, проявляющейся в регуляции синтеза белка MEMB12, семейства N-этилмалеимид-чувствительных белков (SNARE), локализованного в аппарате Гольджи и ответственного за секрецию в апопласт патоген-индуцируемых белков, например, PR-1 [18].

Самыми главными исполнителями РНКи в растениях, без которых вся описанная выше защитная система не работает, являются малые некодирующие РНК, которых в растениях содержится 3 класса: а) 21–22 нт малые интерферирующие РНК (siRNA, small interfering RNA); б) 20–24 нт микро РНК (miRNA, micro RNA); в) 24 нт ассоциированные с повторами siRNA (rasiRNA, repeat-associated siRNA) [32]. Комплементарные цепи дцРНК, взаимодействующие с RISC или RITS, названные siRNA и miRNA, являются основными компонентами, связывающимся с целевой (чужеродной или хозяйской) РНК и препятствующими дальнейшему её функционированию (цепь РНК разрезается или нарушается процесс трансляции). При этом, 21–22 нт siRNA участвуют в непосредственной деградации вирусной РНК и некоторых эндогенных мРНК, важных в защитной системе против вирусов [33], а 24 нт rasiRNA уникальны для растений и участвуют в РНК-направленном метилировании ДНК, что необходимо для поддержания стабильности генома через глушение экспрессии транспозонов и повторяющихся последовательностей ДНК [34].

Биогенез многих малых РНК расшифрован и досконально описан [35], но основное внимание исследователей при этом, как правило, уделяется miRNA, накапливающихся в растениях в ответ на стрессовые факторы среды, включая и биотические. Считается, что miRNA является важным компонентом, вовлеченным в хозяин-индуцированный генный сайленсинг (ХИГС, host-induced gene silencing (HIGS)) [36]. Среди них специфическую роль в растениях при формировании иммунитета к патогенам различной этиологии играли изменения в уровне miR160a, miR396a, miR398b, miR482, miR1444, miR2118 и miR7695, мишенью которых были информационные РНК, ответственные за синтез транскрипционных факторов, рецепторных белков NB-LRR, белков системы РНКи, а также ферментов про-/антиоксидантной системы, регулирующих уровень активных форм кислорода [35]. Растения *S. tuberosum*, как гиперэксперссирующие miR160, так и с подавленным ее уровнем, проявляли крайнюю степень восприимчивости к возбудителю фитофтороза, что предполагает регуляторную роль этой miRNA [37]. Выработка miR159 и miR166, а также их экс-

порт в клетки гриба *Verticillium dahliae* в растениях хлопчатника в ответ на инфицирование коррелировали с формированием у растений устойчивости к грибу [38]. Имеющая гомологию с участком гена, кодирующего транскрипционный фактор AP2/ERF, miR172 идентифицирована как регулятор устойчивости растений томатов к оомицету *Phitophthora infestans* [39]. Точно так же, растения *A. thaliana* секретируют во внеклеточную среду siRNA в составе везикулярных пузырьков, направляющихся в места инфицирования для подавления экспрессии генов вирулентности гриба *Botrytis cinerea* [40]. Секреция в растениях таких внеклеточных везикул происходит не только в ответ на инфицирование, но и при абиотических стрессовых воздействиях, а также при фитогормональном воздействии, предполагая врожденный характер работы механизма РНКи на внешние воздействия. Соответственно, такой транспорт РНК в экзосомах можно будет в будущем использовать при разработке методов доставки siRNA или miRNA к месту инфицирования.

Показана важная роль как сенс-, так и антисенс-последовательностей miR393b в регуляции развития устойчивости растений *A. thaliana* к бактерии *P. syringae* pv. *tomato*, регулирующей экспрессию белка MEMB12 из семейства SNARE. Подавление синтеза белка MEMB12 в мутантных растениях, накапливающих miR393* и ген AGO2, индуцирует экзоцитоз белков PR1. Комплементарная цепь miR393 также вносит свой вклад в антибактериальные реакции, взаимодействуя с белком AGO1 [18]. MiR393 подавляет экспрессию мРНК, кодирующих F-box ауксиновые рецепторы TIR1, AFB2 и AFB3, обычно способствующих экспрессии генов ауксинового ответа. Полученные на паре комплементарных фрагментов miRNA*/miRNA и белков AGO1 и AGO2 результаты – наглядный пример эффективного функционирования иммунитета растений на базе РНКи [18].

Особую, тонко настроенную и мультифункциональную роль в регуляции устойчивости растений к вирусной [41], бактериальной и грибной [42] инфекциям выполняют изоформы miR168. Обнаружено, что предсказанной мишенью 21-нт miR168 является белок Argonaute (AGO1), что доказывается накоплением свободных мРНК-мишени в мутантах с дефектами гена *ago1* [20]. Вместе с тем, в инфицированных растениях томбусвирусный белок-супрессор сайленсинга P19, проявляющий высокое сродство к 21-нт изоформе miR168, препятствует ее взаимодействию с AGO1 и снижает фитоиммунный ответ [41]. В растениях риса *O. sativa*, инфицированных гемибиотрофным грибом *Magnaporthe oryzae*, miR319 проявлял комплементарность по отношению к ключевому ферменту синтеза ЖК – липоксигеназе, что супрессировало ее синтез и снижало устойчивость растений [43]

Интерес представляют данные по регуляции экспрессии защитных генов семейством генов miR482, являющихся исключительными по своему происхождению и нацеленными на нуклеотид-связывающий домен белков NB-LRR [44]. Регуляция активности NB-LRR генов с помощью miRNA, например, miR482f, miR825* и miR5300, драматически отражается на формировании иммунитета растений [35]. При бактериальной инфекции уровень этих miRNAs снижен [45]. Обнаружено подавление базальной и RPS5-опосредованной устойчивости растениях *Arabidopsis* к бактерии *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 посредством контроля экспрессии генов NB-LRR при совместном накоплении в тканях белка RDR6 и miR472 [46]. Выдвигаются предположения, что РНКи, опосредованная miR482/2118, может служить сенсором патологического процесса и настройщиком фитоиммунного ответа [30].

Система РНКи отличается консервативностью и чрезвычайной разборчивостью: каждая распознает и “замалчивает” только свою, целевую РНК. Механизм РНКи играет важную роль в регуляции развития, эпигенетической модификации и в ответных реакциях растений при воздействии различных стрессовых факторов [47], в том числе фитопатогенной природы [40]. Фундаментальная защитная роль механизма РНКи, в первую очередь, проявляется в формировании уникальной естественной защитной стратегии растительного организма против вирусов, патогенов различной природы и даже вредителей и описывается как ХИГС. Поскольку РНКи – продукт совместного эволюционного развития организмов, этот эффективный защитный инструмент может успешно преодолеваться патогенами, в том числе и вирусами [40].

Супрессия хозяйской РНКи. Как и все защитные системы, механизм РНКи не безупречен. Он может успешно “ломаться” патогенами, в том числе и вирусами, то есть метабиом растений, включая вирусы и вредителей, может “умалчивать” этот процесс за счет имеющегося потенциала на разных этапах развития фитоиммунного процесса. Данное противодействие – пример сложной и интенсивной эволюционной борьбы между вирусами, фитопатогенами и фитофагами, с одной стороны, и растениями, с другой. Коэволюция между супрессорами и механизмом РНКи растений также свидетельствует о чрезвычайно сложной природе адаптации мутуалистов, симбиотрофов и патогенов к защитной системе растений.

Подробно о супрессорной активности ряда белков, закодированных в геноме вирусов, описано в обзорных работах [32, 48]. Этот феномен получил название “вирус-индуцированное подавление экспрессии генов” (virus-induced gene silencing, VIGS) [49], как противодействие ХИГС.

Данные, накопленные на современном этапе исследований, говорят о том, что вирусные супрессоры, названные вирусными супрессорами сайленсинга РНКи (viral silencing suppressors of RNA silencing, VSR), обладая широким спектром биохимических свойств, необходимы для подавления хозяйской РНКи как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровнях [3], а также на этапе передачи сигнала о развитии инфекционного процесса [50].

Белок HC-Pro (helper component-proteinase) – первый открытый VSR, кодируемым вирусами семейства *Potyviridae*, эффективно подавляющих защитные реакции и способствующие увеличению титра ВТМ и ВОМ, что доказано на трансгенных растениях табака, синтезирующих этот белок. В инфицированных вирусом растениях *S. tuberosum* белок HC-Pro формировал стабильный комплекс с ферментами метионинового цикла S-аденозил-L-метионин синтетазой 1 (S-adenosyl-L-methionine synthetase) и S-аденозил-L-гомоцистеин гидролазой (S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase), рибосомальными белками и вирусными белком VPg–Pro, а также ключевым белком РНКи – AGO1 [51]. Белок HC-Pro проявил себя как негативный регулятор салицилат-зависимой защитной системы растений, непосредственно взаимодействуя с, например, белком SABP3 [52]. Мутация по гену HC-Pro у YBK возвращала устойчивость образцов картофеля *S. tuberosum*, имеющих ген *Ny* [53]. Точно так же белок C4 вируса курчавости листьев хлопчатника взаимодействовал с S-аденозил-L-метионин синтетазой 1 *N. benthamiana*, ингибируя его ферментативную активность. На мутантных растениях табака с подавленной ее активностью обнаружено замалчивание механизмов генного сайленсинга, что стимулировало развитие вирусов курчавости листьев хлопчатника и желтой курчавости листьев томата [54]. Известно, что белки 2b ВОМ, P0 вируса скручивания листьев картофеля, P38 оболочки вируса морщинистости листьев турнепса и P1 вируса крапчатости листьев батата ингибировали работу комплекса RISC, нарушая работу белков семейства AGO [50]. Белок 2b ВОМ активно вовлекается в систему регуляции защитных систем растений, хотя и индуцирует накопление в инфицированных растениях и СК и ЖК, замалчивает развитие системной устойчивости как по салицилат-, так и жасмонат-индуцируемым путям [17]. Точно так же, с использованием трансгенных растений *A. thaliana* с гиперсинтезом белка 2b показано, что этот белок нарушает работу сигнальной антистрессовой программы, индуцируемой и АБК [55]. Можно предположить, что такое влияние белка 2b ВОМ соответствует установившемуся убеждению, что индуцируемые СК, ЖК и АБК сигнальные пути в растениях взаимно интерферируют друг друга. Кроме того, обнаружено, что нарушение работы жасмонатной сигнальной системы белком 2b происходит посредством его взаимодействия с белками JAZ, что повышает привлекательность хозяина для насекомых и полезно для передачи вируса у арабидопсиса [56].

Вирус западной желтухи свеклы, кодирует белок P0, взаимодействующий с гомологом S фазной киназы (SKP) – компонентом SCF семейства убиквитин E3 лигазы. Показано, что F-box SKP взаимодействует с PAZ доменом в белке AGO1 и подготавливает его к деградации, а выключение экспрессии гена SKP формирует устойчивость к вирусам [57]. Гипернакопление белка P0 в трансформированных растениях *A. thaliana* нарушало развитие растений и повышало уровень siRNA целевых транскриптов, указывая на то, что белок P0 действует на уровне RISC комплекса. Способность P0 вызывать деградацию AGO1 – наглядный пример вирусной адаптации к защитному механизму РНКи. Обнаружено, что белок P0, экспрессирующийся в растениях *S. tuberosum*, инфицированных вирусом скручивания листьев картофеля, вызывает замалчивание механизма РНКи не только в растениях, но и в персиковой тле, переносчике данного вируса, что предполагает схожесть механизмов замалчивания этой защитной системы в растениях и их вредителях [58].

Белок P6, кодируемый вирусом мозаики цветной капусты и требующий для трансляции 35S РНК, подавлял защитную реакцию растений *A. thaliana* при совместном инфицировании вирусом и патогенной бактерией *P. syringae* pv. *tomato*, проявляющуюся в замалчивании окислительного взрыва, снижении уровня СК и зависимой от салицилатов аутофагии [59]. Кроме того, обнаружено, что супрессорный эффект белка P6 отражался на всей системе как салицилат-, так и жасмонат-индуцируемой защитных систем, затрагивая ключевой белок их сигнализации NPR1, что усиливало восприимчивость к биотрофам. При этом трансгенные растения, экспрессирующие белок P6, характеризовались большей устойчивостью к жасмонат-чувствительным патогенам и восприимчивостью к салицилат-чувствительным [60].

Белок P19 вируса кустистой карликовости томатов из семейства *Tombusviridae*, участвующий в процессах репродукции, движения, упаковки РНК и векторной трансмиссии вируса, подавлял защитные реакции в растениях табака *N. benthamiana*. Показано, что этот белок крайне необходим для системного проникновения и распространения вируса в растениях перца (*Capsicum annum*) и шпината (*Spinacia oleracea*). Формирование комплекса между димерами P19 и дц siRNA как *in vivo*, так и *in vitro*, коррелировало с амплитудой симптомов вирусного заболевания в растениях [61]. Таким образом, функция белка P19 состоит в том, что в ходе инфекции он связывает обильно циркулиру-

ющие вирусные siRNA, делая их недоступными для белкового комплекса RISC, и препятствует процессу защитного метилирования siRNA. Таким образом, есть основание предполагать, что способность P19 связывать siRNA может препятствовать работе фермента HEN1, ответственного за метилирование siRNA. Полная инактивация гена P19 приводит к полной деградации вирусной РНК и невозможности синтеза вирусных белков. Точно так же, предварительная обработка растений табака siRNA, эффективно взаимодействующих с белком P19, формировала защиту от вируса кустистой карликовости томатов [61].

Белок P21 (21 кДа) вируса желтухи свеклы подавляет РНК индуцированное умалчивание экспрессии белка GFP. В инфицированных вирусом растениях свеклы *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* белок P21 обнаруживается в клетке в качестве растворимого белка цитоплазмы, а также в форме нерастворимых белковых тел на периферии клетки. Другой гомолог белка P21 вируса цитрусовых тристеза супрессирует РНКи на внутриклеточном и межклеточном уровнях [62], взаимодействуя со дцРНК и siRNA *in vivo*, препятствуя процессу их метилирования, но не воздействует на активность RISC комплекса. Кроме того, обнаружено, что в геноме вируса цитрусовых тристеза обнаружены короткие не кодирующиеся РНК (low-molecular-weight tristeza 1, LMT1), от наличия которых зависела его вирулентность в отношении растений табака *N. benthamiana,* проявляющаяся в резком снижении уровня СК в инфицированных растениях и активации альтернативной оксидазы, подавляющей окислительный взрыв [63].

Белок P38 (CP/p38) оболочки вируса морщинистости листьев турнепса отвечает за системное распространение и межклеточное движение вируса. Данный белок – сильный супрессор РНКи, что связывают с его взаимодействием с вирусной дцРНК вне зависимости от размера молекул. Это означает, что взаимодействие P38 с дцРНК препятствует доступности субстрата для DCL, например, DCL4. Это, соответственно, приводит к ослаблению аккумуляции 21 нт siRNA нуклеазой. Вместе с тем, белок P38 не препятствовал активности белка DCL2, синтезирующей 22 нт siRNA, но эффективно подавлял активность работы белкового комплекса RISC, взаимодействуя с AGO [64]. Такой механизм супрессии защитной системы интересен тем, что 22-нт siRNA, как было отмечено выше, проявляя сродство к белку AGO10, подавлял накопление AGO1 [41].

Цистеин-богатый 17кДа белок γb вируса штриховой мозаики ячменя (ВШМЯ), хотя и не является обязательным для репликации и транспорта вируса, но существенно воздействует на процесс патогенеза, а взаимодействие вирусного белка с РНК – ключевая функция белка γb в супрессии РНКи. Первый косвенный признак возможного участия белка γb в супрессии RNAi был получен в экспериментах с использованием мутанта вируса погремковости табака с нарушенным геном, кодирующим белок P16. Обнаружено, что белок γb взаимодействовал с дцРНК посредством трех Zn-связующих участков, находящихся на N (терминальной части белка), и стимулировался в присутствии Zn ионов [65].

Продукт гена *p122* ВТМ в растениях *S. tuberosum*, инфицированных дикими линиями вируса, репрессировал транскрипцию генов, кодирующих белки *Pidcl2* и *NtDCL2* и РНК-зависимой РНК-полимеразы *Pirdr1* и *NtRdR1*, соответственно, у инфицированных оомицетом *Ph. infestans* растений табака *N. tabaccum*. Нокаут-мутация гена *p122* в линии ВТМ cr-Δ122 восстанавливала способность отмеченных генов растения и оомицета экспрессироваться [66].

Обнаружена высокая супрессорная активность, направленная против антивирусной РНКи, у вирусных генов, кодирующих РНКазы, принадлежащие к семейству III [67]. Важным белком семейства таких потивирусов, как шарки сливы, мозаики турнепса, BMC и YBK, ответственным, с одной стороны, за репликацию вирусной РНК, а с другой, за подавление фитоиммунной системы хозяина, является кодируемая вирусным геномом РНК-зависимая РНК-полимераза NIb, формирующая репликационные комплексы с участием хозяйских белков и супрессирующая NPR1-опосредованный иммунный ответ [68].

Фитогормоны. В функционировании механизма РНКи в растениях важное место занимают фитогормоны. Поскольку СК является одним из ключевых сигнальных молекул, ответственных за индукцию СПУ растений к биотрофным патогенам, интерес представляет ее способность участвовать в работе системы РНКи. Координированная работа белков, вовлеченных в СПУ, с участвующими в РНКи белками пока не полностью расшифрована. Основные компоненты РНКи, такие как эндонуклеазы DCL2, DCL3 или DCL4, не были связаны с СПУ, индуцированной СК или ее функциональными аналогами [69], тогда как усиление транскрипционной активности гена *RdR1* происходило под влиянием СК и зависело от экспрессии белка NPR1 [4]. Соответственно, СК-индуцированная устойчивость к вирусам связана с РНКи через ген *RdR1* и координируется его продуктом. В свою очередь, экспрессия гена *RdR1* усиливала экспрессию генов, кодирующих RdR6 (система РНКи) и альтернативную оксидазу (про-/антиоксидантная система). Такая координация, по всей видимости, является гибкой, поскольку, например, в трансгенных растениях *A. thaliana*, накапливающих вирусный эффекторный белок 2b, экспрессия гена *AGO2* становилась

салицилат чувствительной [17]. Буквально недавно обнаружено, что СК и miR403a, комплементарная фрагменту гена *NbAGO2,* эффективно регулировали экспрессию гена *NbAGO2* в растениях табака *N. benthamiana* [26]. Белки AtAGO2 *A. thaliana* проявляли большую эффективность против PVX в сравнении с NbAGO2 из растений *N. benthamiana* [27]. Таким образом, полученные данные дополнительно объясняют, как защитные системы, ответственные за развитие СПУ и РНКи, могут совместно работать в растениях, как это ранее показано с использованием трансгенных растений NahG, экспрессирующих другой вирусный эффектор РНКи TEV P1/HC-Pro [70].

С использованием линии картофеля NahG-Désirée, дефицитной по СК, показано усиление восприимчивости растений к вирусам в сравнении с исходным сортом Désirée, связанное с падением уровня miR164, miR167, miR169, miR171, miR319, miR390 и miR393 [71]. Устойчивость растений и уровень miRNA восстанавливались после обработки аналогом СК – 2,6-дихлоризоникотиновой кислотой [72], то есть салицилатная сигнальная система вовлекалась в регуляцию РНКи через экспрессию пре-miRNA.

Соответственно, связь РНКи в растениях с салицилатной сигнальной системой не абсолютна. Поскольку в СК-индуцированной устойчивости растений табака к ВТМ и ВОМ белки DCL2, DCL3 и DCL4 не играли значительной роли [17], Lee с соавт. [4] выдвинули предположение, что противовирусная система защиты у растений табака с участием СК дополнительно затрагивает другие механизмы, например, сигнальные процессы, основанные на функционировании митохондриальных альтернативных дыхательных систем. Причем, такая связь была опосредована индукцией экспрессии гена *RDR1*, регулируемой СК [73]. Это говорит о том, что СК в растениях запускает несколько избыточных или параллельных защитных механизмов, как связанных, так и не связанных с белками DCL.

Важную роль в СК-регулируемой устойчивости играют miRNA, например, miR160. Так, линии картофеля с подавленной экспрессией miR160 не запускали в растениях системную приобретенную устойчивость (СПУ), регулируемую СК. Поскольку сигнальные системы, регулируемые СК и ауксинами, являются антагонистичными, можно полагать, что miR160 вовлечена в их перекрестное взаимодействие [37].

Участие АБК в системе защиты растений от вирусной, бактериальной и грибной инфекции обсуждалось ранее [74]. Этот фитогормон, являясь регулятором ответных реакций растений 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, выявлена важная роль АБК в регуляции работы механизма РНКи и, соответственно, в формировании фитоиммунитета к вирусам [55]. В растениях *A. thaliana*, гиперсинтезирующих АБК, индуцируется накопление транскриптов генов *AtAGO4* и *AtAGO10.* Точно так же, АБК индуцировала в линиях сои *Rsv3,* устойчивых к вирусу мозаики, накопление транскриптов гена *GmDCL2* [75]. Роль АБК в формировании устойчивости к вирусам с участием механизмов РНКи обобщена в обзорной работе Alazem и Lon [22]. Так, важность этого гормона в вирусоустойчивости, например, к вирусу мозаики бамбука, была связана с индукцией экспрессии генов *AtAGO1*, *AtAGO2* и *AtAGO3*, а также с репрессией накопления транскриптов *AtAGO4* и *AtAGO10.*

Несмотря на то, что в фитофизиологических реакциях СК и АБК часто обсуждаются с позиции антагонистов, они могут совместно модулировать различные защитные ответы, в том числе и РНКи, например, против вирусов, на уровне регуляции экспрессии генов, кодирующих транскрипционные факторы (транс-факторы), а также основные белки механизма РНКи. Поскольку только в мутантных по уровню СК растениях АБК вызывала экспрессию генов *AGO1* и *RdR1*, можно предположить, что АБК запускает экспрессию генов каскада сигналов салицилат-зависимой экспрессии, а СК регулирует интенсивность накопления защитного продукта [22]. Выявлено, что растения с высоким уровнем синтеза AGO1 слабочувствительны к АБК и, наоборот, при нарушении синтеза AGO1 формируют гиперчувствительность к АБК. На растениях сои устойчивость к вирусу мозаики, опосредованная обработкой АБК, сопровождалась отложением каллозы в зоне плазмодесм и накоплением транскриптов генов *AGO1, AGO4, AGO9, RdR2* и *RdR6* [22]. Показано, что в регуляции синтеза AGO1 с участием АБК важная роль принадлежит miR168, регулирующей противовирусный фитоиммунитет [41]. Полученные данные говорят о тесной связи механизмов РНКи с АБК-опосредованным сигнальным путем формирования устойчивости растений к вирусам.

Жасмонаты индуцируют в растениях устойчивость к некротрофам и вредителям. В отношении вирусных инфекций, а также биотрофных и гемибиотрофных патогенов их роль противоречива. Анализ экспрессии генов AGO в растениях *O. sativa* в условиях инфицирования вирусом штриховатости (rice stripe virus, RSV) показал, что вирус многократно индуцирует гены *OsAGO1a*, *OsAGO1б*, *OsAGO3* и *OsAGO18*, транскрипты которых, вместе с тем, в жасмонат-нечувствительных coi1-13 растениях накапливались в меньшей степени, что коррелировало со степенью развития вируса [30]. В растениях табака в формировании устойчиво-

сти по жасмонатному сигнальному пути к грибу *F. brachygibbosum* оказалось критичным наличие белка NaAGO4 [9] Индуцированное капсидным (коровым) белком (КБ) вируса накопление жасмоновой кислоты (ЖК), формирующее устойчивость растений *O. sativa* к вирусу, связано с активацией гена *OsAGO18* [30]. Снижение накопления ЖК, обусловленное индукцией miR319, в растениях *O. sativa*, инфицированных вирусом лохматой карликовости (rise ragged stunt virus, RRSV), формировало восприимчивость к вирусу [76]. Выявлено, что активация бактериями *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 устойчивости растений *A. thaliana* по жасмонатному сигнальному пути находится под контролем miR846. Это доказывается тем, что гиперэкспрессирующие и, напротив, нокдаун miR846 линии *A. thaliana*, а также растения, обработанные ингибитором синтеза ЖК – диэтилдитиокарбаминовой кислотой, оказались восприимчивы к *P. syringae* DC3000 [77].

Для более полной оценки важности механизма молекулярных отношений между защитной системой организма и вирусами необходимы дальнейшие детальные молекулярные, биохимические и структурные исследования вирусных супрессоров. Но уже известные данные говорят о сложной коэволюционной "гонке вооружений" между хозяевами-растениями и вирусами. Со временем эти знания могут быть реализованы для развития эффективных стратегий создания растений, устойчивых не только к вирусам, но и другим патогенам и вредителям.

РНКи и защита растений. Одним из передовых направлений исследований в данной области можно считать применение связанных с РНКи методов в совершенствовании методов генной инженерии и создании подходов в защите растений от различных патогенов и вредителей. Открытый Файром уникальный механизм РНКи предоставил биологам новый метод управления фенотипом растений и оценки биологической функции белков. Стратегии применения механизмов РНКи основываются на базовых знаниях формирования естественных шпилечных структур вирусными РНК (harpin RNA-mediated interference-based strategies), создания искусственных siRNA (на основе патогенной мРНК) и ta-siRNA (на основе мРНК генов-супрессоров иммунного ответа хозяина). На данный момент основным направлением стало создание генно-модифицированных (ГМ) и генно-редактированных (ГР) сортов и гибридов культур с повышенными показателями урожайности и качества, в том числе и с использованием совмещенной технологии редактирования генов CRISPR/CasN с компонентами технологии РНКи [78]. Первым растением с искусственной системой защиты от вирусной инфекции, основанной на РНКи, получившим разрешение на использование в 1998 г., стал картофель со встроенным геном *Orf1/Orf2* от вируса скручивания листьев [79]. Затем были проведены успешные испытания ГМ растений сливы *Prunus domestica* с геном, кодирующим КБ вируса скрытой мозаики. В США в растениеводство активно внедряются ГМ и ГР сорта тыквы *Cucurbita pepo* и папайи *Carica papaya*, устойчивые к вирусам скрытой мозаики и кольцевой пятнистости, соответственно, а в Китае – сорта сладкого перца *Capsicum annuum* и томатов *S. lycopersicum*. В обзорной работе Sang и Kim [80] приводится не менее 11 вариантов эффективных технологий защиты растений с использованием методов РНКи, например, ячменя *Hordeum vulgare* и пшеницы *Triticum aestivum* от гриба *Fusarium graminearum* с подавлением экспрессии генов *FgCYP 51* (гены биосинтеза эргостерола) и *FgChs3b* (ген хитин-синтазы), соответственно. Компании "Dow AgroSciences" и "Monsanto" (в настоящее время "Bayer CropScience") включили в геном кукурузы *Z. mays* сорта SmartStax Pro (MON87411) вектор, экспрессирующий дцРНК гена *snf7* западного кукурузного жука *Diabrotica virgifera virgifera,* в число мер защиты трансгенов от формирования у вредителей устойчивости к токсину *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) [81].

Известно, что PTGS генов-мишеней может быть вызвано непосредственным введением дцРНК в клетки самого растения путем трансгеноза. Новые системы редактирования генома (gene editing system, GES) расширяют перечень инструментов, доступных для обеспечения устойчивости растений к вирусам с использованием компонентов РНКи. С использованием метода РНКи доказана важность рецепции патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП), в частности хитина, в дальнейшем развитии оксидативного взрыва в зоне инфицирования. Например, сайленсинг гена *CEBiP*, ответственного за связывание хитоолигосахаридов в растениях *O. sativa,* с помощью технологии РНКи приводил к ингибированию образования активных форм кислорода и экспрессии генов, участвующих в иммунном ответе [82]. Zhan с соавт. [78] показали, что линии картофеля *S. tuberosum*, экспрессирующие генно-инженерную кассету CRISPR/Cas13a, содержащую siRNA против РНК вируса картофеля Y, проявляли сниженное накопление вируса в тканях и, соответственно, менее выраженное проявление симптомов заболевания. Обнаружена прямая положительная корреляция устойчивости трансгенных линий с уровнем экспрессии siRNA.

Интересны результаты защиты растений кукурузы *Z. mays* от фуминозин-продуцирующих штаммов грибов *Fusarium verticillioides* с использованием антисенс-конструкций к соответствующим генам *FUM1* и *FUM8*, позволившим многократно снизить концентрацию токсина [83], что, по мнению авторов, позволяет создавать формы растений с соответствующими генами для контроля продукции

токсина возбудителем. Использование генно-модифицированных растений с антисенс-фрагментами жизненно важных генов насекомых позволило многократно снизить их вредоносность. Например, при помощи подобных фрагментов возможно влиять на транскрипционную активность генов, связанных со способностью насекомых деградировать никотин (бражник табачный *Manduca sexta*, *CYP6B46*) [84]), а также на экспрессию генов, кодирующих трипсиноподобную сериновую протеиназу (бурая рисовая цикадка *Nilaparvata lugens*, *Nltry*), трансмембранный белок – транспортер глюкозы (*N. lugens, NlHT1*) [85]. Вместе с тем, трансгенные растения в целом, считая и содержащие гены РНКи, принимаются большинством населения весьма негативно и еще вызывают много вопросов и споров как в правовом, так и экологическом уровнях.

Особый интерес представляют работы, где предлагают использовать механизм РНКи с применением целевой дц РНК в качестве спреев, что открывает новые возможности в развитии научных технологий и стратегий защиты растений, с целью нарушения экспрессии жизненно важных генов вредителей и патогенов. Это направление защиты растений развивается очень быстро и описывается термином “индукция замолкания генов с помощью опрыскивания”, или спрей-индуцированного генного сайленсинга (СИГС, spray induced gene silencing, SIGS) [80, 86]. Уникальность данного метода сочетается также с тем, что, с одной стороны, сами дцРНК могут характеризоваться свойствами ПАМП и запускать защитную систему растительной клетки, связанную с классическими сигнальными системами защиты PTI и ETI, опосредованными активацией рецепторных киназ SERK (somatic embryogenesis receptor-like kinase) и MAPK (mitogen-activated protein kinase), слабо взаимодействующих с механизмами РНКи. С другой стороны, дцРНК могут проникать в ткани растения, амплифицироваться, перерабатываться в siRNA, как правило 22 нт, и индуцировать природные механизмы РНКи и замолкания целевых генов вредителя, патогена или вируса после аппликаций препаратами дцРНК поверхности тканей растений [86].

Есть примеры использования препаратов, содержащих дцРНК, для контроля экспрессии генов патогенов. Так, нанесение препарата с целевой дцРНК на поверхность листьев *N. benthamiana* и *Vigna unguiculata* индуцировало в растениях механизмы РНКи и последующее разрушению РНК, например, вируса мозаики, причем не только при механической инокуляции вируса через поверхность листа, но и при передаче вируса насекомыми [87]. В работе Sammons с соавт. [90] продемонстрирована возможность влияния экзогенной дцРНК на супрессию генов устойчивости к гербициду, что может быть использовано для снижения формирования устойчивости сорняков к пестициду.

Тенлладо с соавт. [88] первыми продемонстрировали, что экзогенное применение молекул дцРНК в растениях в качестве спрея делает их устойчивыми к вирусным инфекциям. С тех пор технология использования дцРНК против вирусной инфекции усовершенствовалась. В целях повышения стабильности дцРНК и продления противовирусной защиты, Миттер с соавт. [89] связали дцРНК со слоистыми наночастицами глины размером 80–300 нм (BioClay). Такой комплекс оказался более защищен от нуклеаз и в меньшей степени смывался с поверхности листьев, и 330-нт дцРНК, нацеленная на КБ ВОМ, обнаруживалась в растениях в течение 30 дней после обработки [89]. Соответствующие результаты получены и при опрыскивании растений табака *N. benthamiana* и вигны *Vigna unguiculata* препаратом, содержащим наночастицы глины BioClay и 461-нт dsRNA, кодирующего КБ вируса мозаики бобов, нацеленного на сайленсинг КБ [87].

Перспективность борьбы с переносчиками вирусов на основе РНКи обсуждается также в аспекте создания различных биопестицидов в виде РНКи-спреев [90], в том числе биоинсектицидов (“RNAi-инсектицидов”), в основном для борьбы с насекомыми, в которой спрей-обработка вегетирующих растений дцРНК “замалчивает” гены вирулентности патогена или жизнедеятельности вредителя [91]. На современном этапе успешно проведены работы по использованию препаратов с использованием siRNA против личинок азиатского кукурузного мотылька (*Ostrinia furnacalis*), насекомых из отряда двукрылых (*Diptera*), например, комаров и мухи цеце, отряда полужесткокрылых (*Hemiptera*), таких как тли, белокрылка, галловыми, цистообразующими и другими паразитическими нематодами растений. Особо следует отметить, что в механизмах запуска РНКи в различных группах насекомых обнаружены физиологические различия, вынуждающие разработчиков дифференцированно подходить к созданию таких препаратов [92]. BASF опубликовал информацию об использовании препаратов на основе технологии РНКи (https://www.researchandmarkets.com/reports/5007781/agricultural-biotechnology-emerging-technologies). К настоящему времени концерн уже запатентовал некоторые изобретения в области средств борьбы с нематодами, использующие механизм РНКи. Предполагается, что максимальная продолжительность “жизни” таких РНК-молекул в составе препаратов будет составлять примерно 20 – 30 дней. Такая схема принципиально отличается от защиты растений с помощью генетической модификации, но требует разработки методов доставки “РНКи-инсектицида”, “РНКи-фунгицида” или

“РНКи-вирицида” в растение, защиты РНК-молекул от солнечного света, смыва дождем.

Установлено, что поступление дцРНК с пищей в организм насекомых может ингибировать экспрессию генов-мишеней и, тем самым, вызывать целевые фенотипические эффекты, например, гибель личинок, взрослых особей, снижение плодовитости и т.д. [92]. Например, у целого ряда опасных насекомых-вредителей *(Mythimna separate, Halyomorpha halys, Nilaparvata lugens, Lymantria dispar, Helicoverpa armigera, Bemisia tabaci, Spodoptera exigua, Chilo suppressalis* и др.) пероральное поступление дцРНК с пищей подавляет активность целевых генов-мишеней. На примере колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* показано, что ингибирование работы дцРНК-специфичных РНКаз усиливает эффект РНК-инсектицидов при пероральном введении [93]. В КНР созданы линии кукурузы *Z. mays* и сои *Glycine max*, экспрессирующие фрагменты гена АТФ-азы клопа слепняка *Apolygus lucorum*, многократно снизившие повреждаемость культур этим вредителем [94]. При создании препаратов на основе РНКи необходимо помнить и о том, что механизм регуляции замалчивания защитных генов в растениях, заселенных вредителями, может быть связан и с симбионтными микробиомами, которые, обладая собственной системой супрессии фитозащитных систем, могут способствовать более активному ими освоению пищевой ниши.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные молекулярные и биохимические исследования супрессоров фитоиммунных реакций различного происхождения значительно расширили представления о всей сложности процесса РНКи, а также заметно углубили наше понимание природы взаимоотношений между растениями и патогенами. Кроме того, на сегодняшний день идентифицированы уже тысячи коротких регуляторных РНК, а сам механизм РНКи на отдельных растительных объектах, например, на арабидопсисе, подробно изучен. Однако, бесспорно то, что очень многое в этой области еще предстоит исследовать. Например, мало известно о роли РНКи в регуляции защиты низших наземных форм растений и водорослей от патогенов, а также ее роли во взаимоотношениях между растениями и паразитарными формами растений. Остаются нераскрытыми физиологические механизмы взаимодействия РНКи с классическими сигнальными фитоиммунными системами, ответственными за системную устойчивость и регулирующимися СК и ЖК. Но, можно полагать, что механизмы РНКи в растительных клетках независимы от индуцируемых ПАМП сигнальных систем защиты и относительно нечувствительны к таким низкомолекулярным сигнальным молекулам как ЖК и СК, активные формы кислорода, ионы кальция и другие вторичные мессенджеры. Потенциалом для исследований может быть также оценка работы механизмов РНКи в условиях формирования многоуровневого растительного микробиома, состоящего, как минимум, из патогена и эндофита и/или симбионта как, например, в системе “хозяин – патоген – эндофитная бактерия”.

С одной стороны, поскольку механизм РНКи является естественным и эффективно работает во всех таксонах живых организмов, предполагается, что фитопатогены (вирусы, бактерии, грибы и оомицеты) и насекомые-вредители такую защитную систему легко обойти не смогут. С другой стороны, поскольку при использовании экзогенных дцРНК целевые эффекты достигаются без изменения структуры генома растений, на них не должны распространяться запреты, связанные с использованием ГМО. Действительно, новозеландское агентство защиты окружающей среды в 2018 г. признало, что организмы, обработанные дцРНК, не относятся к ГМО [95], и, соответственно, разрешило использование препаратов, содержащих дцРНК для индукции РНКи и контроля экспрессии генов (https://www.epa.govt.nz/assets/FileAPI/hsno-ar/APP203395/APP203395-Decision-FINAL-.pdf). Министерство промышленности Новой Зеландии включило РНК в список безопасных для окружающей среды веществ (https://www.mpi.govt.nz/dmsdocument/5134). Правда, это не снимает вопросов перспективности и безопасности использования такого экономически выгодного подхода для укрепления устойчивости растений к вирусам, патогенам и вредителям, поскольку потенциал и безопасность метода аппликаций экзогенной дцРНК слабо исследованы и не все риски еще определены. Вместе с тем, можно полагать, что трансгены на основе РНКи являются выгодными и экологически более чистыми, поскольку такие растения не продуцируют никаких функциональных чужеродных белков и биоцидных веществ, а также не загрязняют окружающую среду.

Данные по функционированию механизмов РНКи позволят разработать весьма эффективные стратегии борьбы с комплексом патогенов и вредителей в агроценозе, способствующие повышению урожайности сельскохозяйственных культур, избегая при этом применения экологически опасных пестицидов. Возможность молекулярного переключения (активации) генов устойчивости к заболеваниям, индуцированное хозяином глушение генов патогена и даже вредителя также предоставляет возможность для разработки нового поколения пестицидов на основе дцРНК. Особо следует отметить то, что технологии регуляции численности вредителей, патогенов и вирусов в агроценозе могут быть осуществлены как путем классического внедрения векторов с кассетами РНКи в геном растений и регулирования работы

природных механизмов ХИГС, так и использованием дцРНК в виде спреев непосредственно для обработки растений или привлечения эндофитов, как генераторов РНКи.

Таким образом, экзогенное применение молекул дцРНК с потенциалом запуска РНКи является мощным инструментом в современных платформах защиты растений и улучшения урожая, учитывая политическое и общественное давление для устойчивого решения текущих сельскохозяйственных проблем. Имеющиеся в настоящее время данные свидетельствуют о том, что присутствие молекул системы РНКи в рационе человека не представляет для него угрозы [96]. Вместе с тем, при явном положительном защитном эффекте целевых дцРНК в экспериментальных условиях, остаются вопросы по подбору гиперпродуцентов дцРНК, массовому накоплению целевого продукта, обеспечению его сохранности и использования в полевых условиях для защиты растений от патогенов и вредителей.

Работа выполнена в рамках совместного международного гранта Российского научного фонда Российской Федерации № 19-46-02004 и Департамента науки и техники (DST) правительства Индии № C/1756/IFD/2019-20.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fire A.Z.* WITHDRAWN: Gene silencing by double-stranded RNA // Cell Death Differ. 2007. V. 14. P. 1998. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402253
2. *Muhammad T., Zhang F., Zhang Y., Liang Y.* RNA Interference: A natural immune system of plants to counteract biotic stressors // Cells. 2019. V. 8: 38. https://doi.org/10.3390/cells8010038
3. *Rakhshandehroo F., Rezaee S., Palukaitis P.* Silencing the tobacco gene for RNA-dependent RNA polymerase 1 and infection by potato virus Y cause remodeling of cellular organelles // Virology. 2017. V. 510. P. 127. https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.07.013
4. *Lee W.S., Fu S.F., Li Z., Murphy A.M., Dobson E.A., Garland L., Chaluvadi S.R., Lewsey M.G., Nelson R.S., Carr J.P.* Salicylic acid treatment and expression of an RNA-dependent RNA polymerase 1 transgene inhibit lethal symptoms and meristem invasion during tobacco mosaic virus infection in *Nicotiana benthamiana* // BMC Plant Biol. 2016. V. 16: 15. https://doi.org/10.1186/s12870-016-0705-8
5. *Hunter L.J.R., Brockington S.F., Murphy A.M., Pate A.E., Gruden K., Macfarlane S.A., Palukaitis P., Carr J.P.* RNA-dependent RNA polymerase 1 in potato (*Solanum tuberosum*) and its relationship to other plant RNA-dependent RNA polymerases // Sci. Rep. 2016. V. 6: 23082. https://doi.org/10.1038/srep23082
6. *Qin L., Mo N., Zhang Y., Muhammad T., Zhao G., Zhang Y., Liang Y.* CaRDR1, an RNA-dependent RNA polymerase plays a positive role in pepper resistance against TMV // Front Plant Sci. 2017. V. 8. P. 1068. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01068
7. *Campos L., Granell P., Tárraga S., López-Gresa P., Conejero V., Bellés J.M., Rodrigo I., Lisón P.* Salicylic acid and gentisic acid induce RNA silencing-related genes and plant resistance to RNA pathogens // Plant Physiol. Biochem. 2014. V. 77. P. 35. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.01.016
8. *Prakash V., Chakraborty S.* Identification of transcription factor binding sites on promoter of RNA-dependent RNA polymerases (RDRs) and interacting partners of RDR proteins through in silico analysis // Physiol Mol Biol Plants. 2019 V. 25(4). P. 1055. https://doi.org/10.1007/s12298-019-00660-w
9. *Pradhan M., Pandey P., Baldwin I.T., Pandey S.P.* Argonaute 4 modulates resistance to *Fusarium brachygibbosum* infection by regulating jasmonic acid signaling // Plant Physiol. 2020. V. 184. P. 1128. https://doi.org/10.1104/pp.20.00171
10. *Hong W., Qian D., Sun R., Jiang L., Wang Y., Wei C., Zhang Z., Li Y.* OsRDR6 plays role in host defense against double-stranded RNA virus, Rice Dwarf Phytoreovirus // Sci. Rep. 2015. V. 5: 11324. https://doi.org/10.1038/srep11324
11. *Song X., Ying X.* Salicylic acid deficient *Nicotiana benthamiana* attenuated virus induced gene silencing but did not affect transgene-induced posttranscriptional gene silencing nor general biogenesis of microRNAs // Physiol. Mol. Plant Pathol. 2019. V. 106. P. 276. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2019.03.005
12. *Fei Q., Yu Y., Liu L., Zhang Y., Baldrich P., Dai Q., Chen X., Meyers B.C.* Biogenesis of a 22-nt microRNA in *Phaseoleae* species by precursor-programmed uridylation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115. P. 8037. https://doi.org/10.1073/pnas.1807403115
13. *Wagh S.G., Alam M.M., Kobayashi K., Yaeno T., Yamaoka N., Toriba T., Hirano H.Y., Nishiguchi M.* Analysis of rice RNA-dependent RNA polymerase 6 (*OsRDR6*) gene in response to viral, bacterial and fungal pathogens // J. Gen. Plant Pathol. 2016. V. 82. P. 12. https://doi.org/10.1007/s10327-015-0630-y
14. *Mukherjee K., Campos H., Kolaczkowski B.* Evolution of animal and plant Dicers: early parallel duplications and recurrent adaptation of antiviral RNA binding in plants // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. P. 627. https://doi.org/10.1093/molbev/mss263
15. *Liu Q., Feng Y., Zhu Z.* Dicer-like (DCL) proteins in plants // Funct. Integr. Genomics. 2009. V. 9. P. 277. https://doi.org/10.1007/s10142-009-0111-5
16. *Garcia-Ruiz H., Carbonell A., Hoyer J.S., Fahlgren N., Gilbert K.B., Takeda A., Giampetruzzi A., Garcia-Ruiz M.T., McGinn M.G., Lowery N., Martinez Baladejo M.T., Carrington J.C.* Roles and programming of Arabidopsis Argonaute proteins during turnip mosaic virus infection // PLoS Pathog. 2015. V. 11: e1004755. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004755

17. *Lewsey M.G., Murphy A.M., Maclean D., Dalchau N., Westwood J.H., Macaulay K., Bennett M.H., Moulin M., Hanke D.E., Powell G., Smith A.G., Carr J.P.* Disruption of two defensive signaling pathways by a viral RNA silencing suppressor // Mol. Plant Microbe Interact. 2010. V. 23(7). P. 835.
https://doi.org/10.1094/MPMI-23-7-0835

18. *Zhang X., Zhao H., Gao S., Wang W.C., Katiyar-Agarwal S., Huang H.D., Raikhel N., Jin H.* Arabidopsis Argonaute 2 regulates innate immunity via miRNA393*-mediated silencing of a golgi-localized SNARE gene, MEMB12 // Mol. Cell. 2011. V. 42. P. 356.
https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.010

19. *Jia H., Kolaczkowski O., Rolland J., Kolaczkowski B.* Increased affinity for RNA targets evolved early in animal and plant Dicer lineages through different structural mechanisms // Mol. Biol. Evol. 2017. V. 34. P. 3047.
https://doi.org/10.1093/molbev/msx187

20. *Luan F., Han Y., Zhu H., Shao Y., Chen A., Tian H., Luo Y., Zhu B.* Computational predicting novel MicroRNAs in tomato and validating with RT-PCR. // Russ. J. Plant Physiol. 2010. V.57. P. 469.
https://doi.org/10.1134/S1021443710040035

21. *Carbonell A., Carrington J.C.* Antiviral roles of plant Argonautes // Curr. Opin. Plant Biol. 2015. V.27. P. 111.
https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.06.013

22. *Alazem M., Lon N.-Sh.* Interplay between ABA signaling and RNA silencing in plant viral resistance // Curr. Opin. Virol. 2020. V. 42. P. 1.
https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.02.002

23. *Qu F., Ye X., Morris T.J.* Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 14732.
https://doi.org/10.1073/pnas.0805760105

24. *Paudel D.B., Ghoshal B., Jossey S., Ludman M., Fatyol K., Sanfaçon H.* Expression and antiviral function of ARGONAUTE 2 in *Nicotiana benthamiana* plants infected with two isolates of tomato ringspot virus with varying degrees of virulence // Virology. 2018. V. 524. P. 127.
https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.08.016

25. *Odokonyero D., Mendoza M.R., Alvarado V.Y., Zhang J., Wang X., Scholthof H.B.* Transgenic down-regulation of ARGONAUTE2 expression in *Nicotiana benthamiana* interferes with several layers of antiviral defenses // Virology. 2015. V. 486. P. 209.
https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.09.008

26. *Diao P., Zhang Q., Sun H., Ma W., Cao A., Yu R., Wang J., Niu Y., Wuriyanghan H.* miR403a and SA are involved in *NbAGO2* mediated antiviral defenses against TMV infection in *Nicotiana benthamiana* // Genes. 2019. V. 10(7): 526.
https://doi.org/10.3390/genes10070526

27. *Brosseau C., Bolaji A., Roussin-Léveillée C., Zhao Z., Biga S., Moffett P.* Natural variation in the *Arabidopsis* AGO2 gene is associated with susceptibility to potato virus X // New Phytol. 2020. V. 226. P. 866.
https://doi.org/10.1111/nph.16397

28. *Ma X., Nicole M.C., Meteignier L.V., Hong N., Wang G., Moffett P.* Different roles for RNA silencing and RNA processing components in virus recovery and virus-induced gene silencing in plants // J. Exp. Bot. 2015. V. 66. P. 919.
https://doi.org/10.1093/jxb/eru447

29. *Harvey J.J.W., Lewsey M.G., Patel K., Westwood J., Heimstädt S., Carr J.P., Baulcombe D.C.* An antiviral defense role of AGO2 in plants // PLoS One. 2011. V. 6: e14639.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014639

30. *Yang Z., Huang Y., Yang J., Yao S., Zhao K., Wang D., Qin Q., Bian Z., Li Y., Lan Y., Zhou T., Wang H., Liu Ch., Wang W., Qi Y., Xu Z., Li Y.* Jasmonate signaling enhances RNA silencing and antiviral defense in rice // Cell Host Microbe. 2020. V 28. P. 89.
https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.001

31. *Agorio A., Vera P.* Argonaute 4 is required for resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2007. V. 19. P. 3778.
https://doi.org/10.1105/tpc.107.054494

32. *Leonetti P., Miesen P., van Rijb R.P., Pantaleoa V.* Viral and subviral derived small RNAs as pathogenic determinants in plants and insects // Adv. Virus Res. 2020. V. 107. P. 1.
https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2020.04.001

33. *Guo Z., Li Y., Ding S.W.* Small RNA-based antimicrobial immunity // Nat. Rev. Immunol. 2019. V.19. P. 31.
https://doi.org/10.1038/s41577-018-0071-x

34. *Lewsey M.G., Hardcastle T.J., Melnyk C.W., Molnar A., Valli A., Urich M.A., Nery J.R., Baulcombe D.C., Ecker J.R.* Mobile small RNAs regulate genome-wide DNA methylation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113: E801.
https://doi.org/10.1073/pnas.1515072113

35. *Huang Ch.-Y., Wang H., Hu P., Hamby R., Jin H.* Small RNAs – big players in plant-microbe interactions // Cell Host Microbe. 2019. V. 26. P. 173.
https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.07.021

36. *Qi T., Guo J., Peng H., Liu P., Kang Z., Guo J.* Host-induced gene silencing: A powerful strategy to control diseases of wheat and barley // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20: 206.
https://doi.org/10.3390/ijms20010206

37. *Natarajan B., Kalsi H.S., Godbole P., Malankar N., Thiagarayaselvam A., Siddappa S., Thulasiram H.V., Chakrabarti S.K., Banerjee A.K.* miRNA160 is associated with local defense and systemic acquired resistance against *Phytophthora infestans* infection in potato // J. Exp. Bot. 2018. V. 69. P. 2023.
https://doi.org/10.1093/jxb/ery025

38. *Zhang T., Zhao Y.L., Zhao J.H., Wang S., Jin Y., Chen Z.Q., Fang Y.Y., Hua C.L., Ding S.W., Guo H.S.* Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen // Nat. Plants. 2016. V. 2. P. 1.
https://doi.org/10.1038/nplants.2016.153

39. *Luan Y., Cui J., Li J., Jiang N., Liu P., Meng J.* Efective enhancement of resistance to *Phytophthora infestans* by overexpression of miR172a and b in *Solanum lycopersicum* // Planta. 2018. V. 247. P. 127.
https://doi.org/10.1007/s00425-017-2773-x

40. *Cai Q., He B., Kogel K.H., Jin H.* Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi-nature's blueprint for modern crop protection strategies // Curr. Opin.

Microbiol. 2018. V. 46. P. 58.
https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.02.003

41. *Iki T., Clery A., Bologna N.G., Sarazin A., Brosnan C.A., Pumplin N., Allain F.H.T., Voinnet O.* Structural flexibility enables alternative maturation, ARGONAUTE sorting and activities of miR168, a global gene silencing regulator in plants // Mol. Plant. 2018. V.11. P. 1008.
https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.05.006

42. *Yu X., Hou Y., Chen W., Wang S., Wang P., Qu S. Malus hupehensis* miR168 targets to ARGONAUTE1 and contributes to the resistance against *Botryosphaeria dothidea* infection by altering defense responses // *Plant Cell Physiol*. 2017. V. 58(9). P. 1541.
https://doi.org/10.1093/pcp/pcx080

43. *Zhang X., Bao Y., Shan D., Wang Z., Song X., Wang Z., Wang J., He L., Wu L., Zhang Z., Niu D., Jin H., Zhao H. Magnaporthe oryzae* induces the expression of a microRNA to suppress the immune response in rice // Plant Physiol. 2018. V. 177. P. 352.
https://doi.org/10.1104/pp.17.01665

44. *Han G.Z.* Origin and evolution of the plant immune system // New Phytol. 2019. V. 222. P. 70.
https://doi.org/10.1111/nph.15596

45. *Niu D., Xia J., Jiang C., Qi B., Ling X., Lin S., Zhang W., Guo J., Jin H., Zhao H. Bacillus cereus* AR156 primes induced systemic resistance by suppressing and activating defense-related genes in Arabidopsis // J. Integr. Plant Biol. 2016. V. 58. P. 426.
https://doi.org/10.1111/jipb.12446

46. *Boccara M., Sarazin A., Thiébeauld O., Jay F., Voinnet O., Navarro L., Colot V.* The Arabidopsis miR472-RDR6 silencing pathway modulates PAMP- and effector-triggered immunity through the post-transcriptional control of disease resistance genes // PLoS Pathog. 2014. V. 10: e1003883.
https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003883

47. *Lee C.H., Carroll B.J.* Evolution and diversification of small RNA pathways in flowering plants // Plant Cell Physiol. 2018. V. 59. P. 2169.
https://doi.org/10.1093/pcp/pcy167

48. *Omarov R.T., Bersimbai R.I.* Biochemical mechanisms of suppression of RNA interference by plant viruses // Biochemistry. 2010. V. 75. P. 965.
https://doi.org/10.1134/S0006297910080031

49. *Lange M., Yellina A.L., Orashakova S., Becker A.* Virus-induced gene silencing (VIGS) in plants: An overview of target species and the virus-derived vector systems // Virus-induced gene silencing: Methods and protocols, methods in molecular biology / Ed. Becker A. New York: Springer Science, 2013. P. 1.
https://doi.org/10.1007/978-1-62703-278-0_1

50. *Senshu H., Yamaji Y., Minato N., Shiraishi T., Maejima K., Hashimoto M., Miura C., Neriya Y., Namba S.* A dual strategy for the suppression of host antiviral silencing: two distinct suppressors for viral replication and viral movement encoded by potato virus M // J. Virol. 2011. V. 85. P. 10269.
https://doi.org/10.1128/JVI.05273-11

51. *Ivanov K.I., Eskelin K., Bašic M., De S., Lõhmus A., Varjosalo M., Makinen K.* Molecular insights into the function of the viral RNA silencing suppressor HCPro // Plant J. 2016. V. 85. P. 30.
https://doi.org/10.1111/tpj.13088

52. *Poque S., Wu H.W., Huang C.H., Cheng H.W., Hu W.C., Yang J.Y., Wang D., Yeh S.D.* Potyviral gene-silencing suppressor HCPro interacts with salicylic acid (SA)-binding protein 3 to weaken SA-mediated defense responses // Mol. Plant Microbe Interact. 2018. V. 31. P. 86.
https://doi.org/10.1094/MPMI-06-17-0128-FI

53. *Tian Y.P., Valkonen J.P.* Genetic determinants of Potato virus Y required to overcome or trigger hypersensitive resistance to PVY strain group O controlled by the gene Ny in potato // Mol. Plant Microbe Interact. 2013. V. 26. P. 297.
https://doi.org/10.1094/MPMI-09-12-0219-R

54. *Ismayil A., Haxim Y., Wang Y., Li H., Qian L., Han T., Chen T., Jia Q., Yihao Liu A., Zhu S., Deng H., Gorovits R., Hong Y., Hanley-Bowdoin L., Liu Y.* Cotton Leaf Curl Multan virus C4 protein suppresses both transcriptional and post-transcriptional gene silencing by interacting with SAM synthetase // PLoS Pathog. 2018. V. 14: e1007282.
https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007282

55. *Westwood J.H., McCann L., Naish M., Dixon H., Murphy A.M., Stancombe M.A., Bennett M.H., Powell G., Webb A.A., Carr J.P.* A viral RNA silencing suppressor interferes with abscisic acid-mediated signalling and induces drought tolerance in *Arabidopsis thaliana* // Mol. Plant Pathol. 2013. V. 14. P. 158.
https://doi.org/0.1111/j.1364-3703.2012.00840.x

56. *Wu D., Qi T., Li W.X., Tian H., Gao H., Wang J., Ge J., Yao R., Ren C., Wang X.B., Liu Y., Kang L., Ding Sh.-W., Xie D.* Viral effector protein manipulates host hormone signaling to attract insect vectors // Cell Res. 2017. V. 27. P. 402.
https://doi.org/10.1038/cr.2017.2

57. *Burgyan J., Havelda Z.* Viral suppressors of RNA silencing // Trends Plant Sci. 2011. V. 16. P. 265.
https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.02.010

58. *Pinheiro P.V., Wilson J.R., Xu Y., Zheng Y., Rebelo A.R., Hosseini S.F., Kruse A., Dos Silva R.S., Xu Y., Kramer M., Giovannoni J., Fei Z., Gray S., Heck M.* Plant viruses transmitted in two different modes produce differing effects on small RNA-mediated processes in their aphid vector // Phytobiomes J. 2019. V.3 P.71.
https://doi.org/10.1094/PBIOMES-10-18-0045-R

59. *Zvereva A.S., Golyaev V., Turco S., Gubaeva E.G., Rajeswaran R., Schepetilnikov M.V., Srour O., Ryabova L.A., Boller T., Pooggin M.M.* Viral protein suppresses oxidative burst and salicylic acid-dependent autophagy and facilitates bacterial growth on virus-infected plants // New Phytol. 2016. V. 211. P. 1020.
https://doi.org/10.1111/nph.13967

60. *Love A.J., Geri C., Laird J., Carr C., Yun B.W., Loake G.J., Tada Y., Sadanandom A., Milner J.J.* Cauliflower mosaic virus protein P6 inhibits signaling responses to salicylic acid and regulates innate immunity // PLoS One. 2012. V. 7: e47535.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047535

61. *Sutula M.Y., Akbassova A.Z., Yergaliyev T.M., Nurbekova Z.A., Mukiyanova G.S., Omarov R.T.* Endowing plants with tolerance to virus infection by their preliminary treatment with short interfering RNAs // Russ. J. Plant Physiol. 2017. V. 64. P. 939.
https://doi.org/10.1134/S1021443717060103

62. *Scholthof H.B.* Heterologous expression of viral RNA interference suppressors: RISC management // Plant Physiol. 2007. V. 145. P. 1110.
https://doi.org/10.1104/pp.107.106807

63. *Kang S.H., Sun Y.D., Atallah O.O., Huguet-Tapia J.C., Noble J.D., Folimonova S.Y* A Long non-coding RNA of *Citrus tristeza virus*: Role in the virus interplay with the host immunity // Viruses. 2019 V. 11: 436.
https://doi.org/10.3390/v11050436

64. *Chattopadhyay M., Stupina V.A., Gao F., Szarko C.R., Kuhlmann M.M., Yuan X., Shi K., Simon A.E.* Requirement for host RNA-silencing components and the virus-silencing suppressor when second-site mutations compensate for structural defects in the 3' untranslated region // J. Virol. 2015. V. 89. P. 11603.
https://doi.org/10.1128/JVI.01566-15

65. *Yamamura Y., Scholthof H.B.* Tomato bushy stunt virus: a resilient model system for studying virus-plant interactions // Mol. Plant Pathol. 2005. V. 6. P. 491.
https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00301.x

66. *Mascia T., Labarile R., Doohan F., Gallitelli D.* Tobacco mosaic virus infection triggers an RNAi-based response in *Phytophthora infestans* // Scientific Reports. 2019. V. 9: 2657.
https://doi.org/10.1038/s41598-019-39162-w

67. *Kreuze J.F., Savenkov E.I., Cuellar W., Li X., Valkonen J.P.* Viral class 1 RNase III involved in suppression of RNA silencing // J. Virol. 2005. V. 11. P. 7227.
https://doi.org/10.1128/JVI.79.11.7227-7238.2005

68. *Shen W., Shi Y., Dai Z., Wang A.* The RNA-dependent RNA polymerase NIb of potyviruses plays multifunctional, contrasting roles during viral infection // Viruses. 2020. V. 12: 77.
https://doi.org/10.3390/v12010077

69. *Matsuo Y., Novianti F., Takehara M., Fukuhara T., Arie T., Komatsu K.* Acibenzolar-S-methyl restricts infection of *Nicotiana benthamiana* by plantago asiatica mosaic virus at two distinct stages // Mol. Plant Microbe Interac. 2019. V. 32. P. 1475.
https://doi.org/10.1094/MPMI-03-19-0087-R

70. *Alamillo J.M., Saénz P., García J.A.* Salicylic acid-mediated and RNA-silencing defense mechanisms cooperate in the restriction of systemic spread of plum pox virus in tobacco // Plant J. 2006. V. 48. P. 217.
https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02861.x

71. *Xia R., Xu J., Meyers B.C.* The emergence, evolution, and diversification of the miR390-TAS3-ARF pathway in land plants // Plant Cell. 2017. V. 29. P. 1232.
https://doi.org/10.1105/tpc.17.00185

72. *Baebler S., Stare K., Kovac M., Blejec A., Prezelj N., Stare T., Kogovsek P., Pompe-Novak M., Rosahl S., Ravnikar M., Gruden K.* Dynamics of responses in compatible potato-potato virus Y interaction are modulated by salicylic acid // PLoS One. 2011. V. 6: e29009.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029009

73. *Murphy A.M., Zhou T., Carr J.P.* An update on salicylic acid biosynthesis, its induction and potential exploitation by plant viruses // Curr. Opin. Virol. 2020. V. 42. P. 8.
https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.02.008

74. *Maksimov I.V.* Abscisic acid in the plants–pathogen interaction // Russ. J. Plant Physiol. 2009. V. 56. P. 742.
https://doi.org/10.1134/S102144370906003X

75. *Alazem M., Kim K.H., Lin N.S.* Effects of abscisic acid and salicylic acid on gene expression in the antiviral RNA silencing pathway in Arabidopsis // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20: E2538.
https://doi.org/10.3390/ijms20102538

76. *Zhang C., Ding Z., Wu K., Yang L., Li Y., Yang Z., Shi S., Liu X., Zhao S., Yang Z., Wang Y., Zheng L., Wei J., Du Z., Zhang A., Miao H., Li Y., Wu Z., Wu J.* Suppression of jasmonic acid-mediated defense by viral-inducible microRNA319 facilitates virus infection in rice // Mol. Plant 2016. V. 9. P. 1302.
https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.06.014

77. *Xie S., Jiang H., Ding T., Xu Q., Chai W., Cheng B. Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 represses plant miR846 to induce systemic resistance via a jasmonic acid-dependent signalling pathway // Mol. Plant Pathol. 2018. V. 19. P. 1612.
https://doi.org/10.1111/mpp.12634

78. *Singh K., Dardick Ch., Kindu J.K.* RNAi-mediated resistance against viruses in perinnial fruit plants // Plants. 2019. V. 8: 359.
https://doi.org/103390/plants8100359

79. *Ares X., Calamante G., Cabral S., Lodge J., Hemenway P., Beachy R.N., Mentaberry A.* Transgenic plants expressing potato virus X ORF2 protein (p24) are resistant to tobacco mosaic virus and Ob tobamoviruses // J. Virol. 1998 V. 72. P. 731.
https://doi.org/10.1128/JVI.72.1.731-738.1998

80. *Sang H., Kim J.* Advanced strategies to control plant pathogenic fungi by host-induced gene silencing (HIGS) and spray-induced gene silencing (SIGS) // Plant Biotechnol. Rep. 2020. V. 14. P. 1.
https://doi.org/10.1007/s11816-019-00588-3

81. *Bachman P.M., Bolognesi R., Moar W.J., Mueller G.M., Paradise M.S., Ramaseshadri P., Tan J., Uffman J.P., Warren J., Wiggins B.E., Levine S.L.* Characterization of the spectrum of insecticidal activity of a double-stranded RNA with targeted activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) // Transgenic Res. 2013. V. 22. P. 1207.
https://doi.org/10.1007/s11248-013-9716-9715

82. *Kouzai Y., Nakajima K., Hayafune M., Ozawa K., Kaku H., Shibuya N., Minami E., Nishizawa Y.* CEBiP is the major chitin oligomer-binding protein in rice and plays a main role in the perception of chitin oligomers // Plant Mol. Biol. 2014. V. 84. P. 519.
https://doi.org/10.1007/s11103-013-0149-6

83. *Johnson E.T., Proctor R.H., Dunlap C.A., Busman M.* Reducing production of fumonisin mycotoxins in *Fusarium verticillioides* by RNA interference // Mycotoxin Res. 2018. V. 34: 29.
https://doi.org/0.1007/s12550-017-0296-8

84. *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.
https://doi.org/10.1073/pnas

85. *Zha W., Peng X., Chen R., Du B., Zhu L., He G.* Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-me-

diated RNA interference in the hemipteran insect *Nilaparvata lugens* // PLoS One. 2011. V. 6: e20504. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020504

86. *Dalakouras A., Wassenegger M., Dadami E., Ganopoulos I., Pappas M.L., Papadopouloua K.* Genetically modified organism-free RNA interference: Exogenous application of RNA molecules in plants // Plant Physiol. 2020. V. 182. P. 38. www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.19.00570
87. *Worrall E.A., Bravo-Cazar A., Nilon A.T., Fletcher S.J., Robinson K.E., Carr J.P., Mitter N.* Exogenous application of RNAi-inducing double-stranded RNA inhibits aphid-mediated transmission of a plant virus // Front. Plant Sci. 2019. V. 10: 265. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00265
88. *Tenllado F., Díaz-Ruíz J.R.* Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection // J. Virol. 2001. V. 75. P. 12288. https://doi.org/10.1128/JVI.75.24.12288-12297.2001
89. *Mitter N., Worrall E.A., Robinson K.E., Li P., Jain R.G., Taochy C., Fletcher S.J., Carroll B.J., Lu G.Q., Xu Z.P.* Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses // Nat. Plants. 2017. V. 3: 16207. https://doi.org/10.1038/nplants.2016.207
90. *Fletcher S.J., Reeves P.T., Hoang B.T., Mitter N.* A perspective on RNAi-based biopesticides // Front. Plant Sci. 2020. V. 11: 51. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00051
91. *Wang M., Jin H.* Spray-induced gene silencing: a powerful innovative strategy for crop protection // Trends Microbiol. 2017. V. 25. P. 4. https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.011
92. *Christiaens O., Whyard S., Velez A.M., Smagghe G.* Double-stranded RNA technology to control insect pests: current status and challenges // Front. Plant Sci. 2020. V. 11: 451. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00451
93. *Spit J., Philips A., Wynant N., Santos D., Plaetinck G., Van den Broeck J.* Knockdown of nuclease activity in the gut enhances RNAi efficiency in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, but not in the desert locust, *Schistocerca gregaria* // Insect Biochem. Mol. Biol. 2017. V. 81. P. 103. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.01.004
94. *Liu F., Yang B., Zhang A., Ding D., Wang G.* Plant-mediated RNAi for controlling *Apolygus lucorum* // Front Plant Sci. 2019. V. 10. P. 64. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00064
95. *Heinemann J.A.* Should dsRNA treatment sapplied in outdoor environments be regulated? // Environ. Int. 2019. V. 4. P. 104856. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.050
96. *Sherman J., Munyikwa T., Chan S., Petrick J., Witwer K., Choudhuri S.* RNAi technologies in agricultural biotechnology // Regul. Toxicol. Pharmacol. 2015. V. 73. P. 671. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.001