

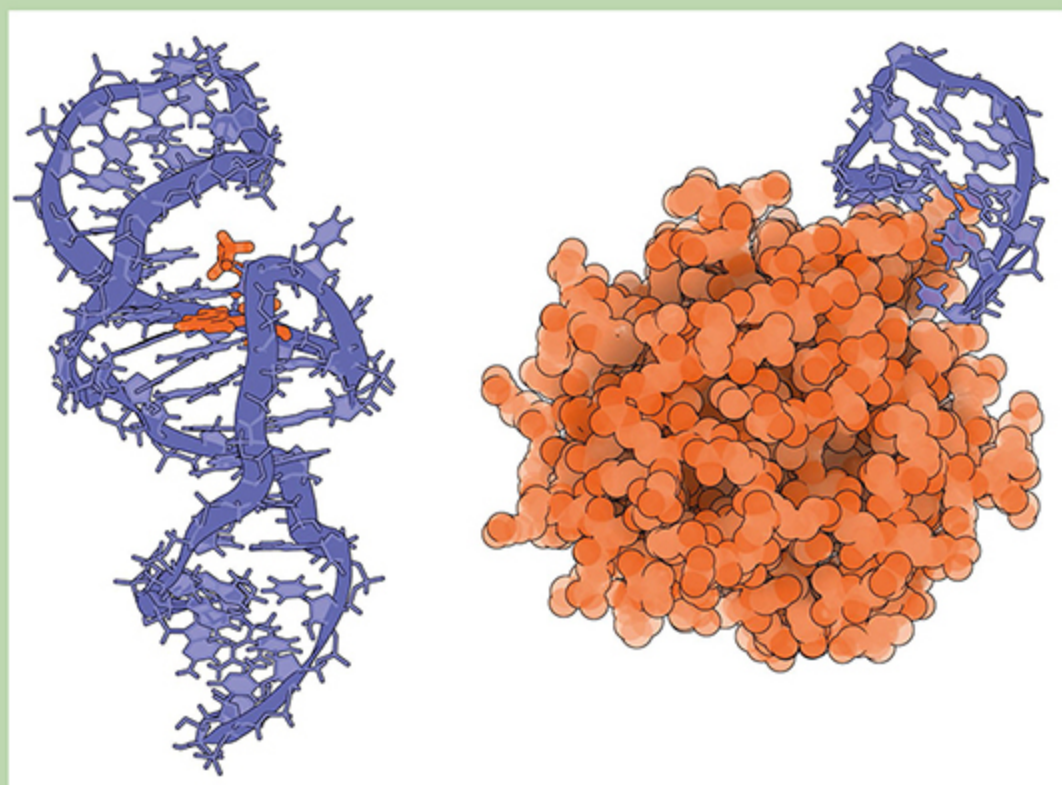


ISSN 1727-1320 (Print),
ISSN 2308-6459 (Online)

ВЕСТНИК ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

PLANT PROTECTION NEWS

2022 TOM 105 ВЫПУСК 1
 VOLUME ISSUE



Санкт-Петербург
St. Petersburg, Russia

МЕТОД РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ ОТ НАСЕКОМЫХ-ВРЕДИТЕЛЕЙ

В.С. Журавлев*, В.В. Долгих, С.А. Тимофеев, Ф.Б. Ганнибал

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург

* ответственный за переписку, e-mail: v.guravlev@hotmail.com

РНК-интерференция, или подавление экспрессии генов малыми РНК, описанное у нематоды *Caenorhabditis elegans* в 1998 году, в настоящее время находит широкое практическое применение, в том числе и в области защиты растений. Использование молекул двуцепочечной РНК в качестве индуктора пути РНК-интерференции у насекомых-вредителей позволяет рассматривать их как основу для создания современных пестицидов. В данном обзоре приводятся данные об особенностях механизма искусственно-индуцированной РНК-интерференции и существующих стратегиях доставки малых РНК в организм насекомого для защиты растений. Главные достоинства данного подхода заключаются в специфичности действия и использовании естественного механизма, лежащего в основе противовирусной защиты клетки. Среди основных недостатков следует указать невосприимчивость отдельных видов вредителей к механизму и быструю деградацию малых РНК. Для прогресса в этой области необходимы дальнейшие глубокие исследования, однако уже сейчас понятно, что в скором времени пестициды на основе малых РНК существенно обогатят арсенал средств и способов защиты растений.

Ключевые слова: малые РНК, РНК-пестициды, сайленсинг гена, молекулярная защита растений

Поступила в редакцию: 23.01.2022

Принята к печати: 31.03.2022

Введение

РНК-интерференция (англ. *RNA interference*, РНКи) – консервативный механизм регуляции экспрессии генов посредством деградации мРНК, а также ряда других эффектов, например репрессии трансляции или ремоделирования хроматина, обнаруженный у всех эукариотических организмов (Fire et al., 1998; Zotti et al., 2018; Goulin et al., 2019). Хотя сам механизм РНК-интерференции открыт в 1998 году при исследовании малых РНК у нематоды *Caenorhabditis elegans*, к тому моменту уже был накоплен ряд данных о подавлении активности генов под действием антисмысловых РНК у растений и грибов (Napoli et al., 1990; Fire et al., 1991; Romano et al., 1992). В настоящее время РНКи считается эволюционно древним механизмом защиты организма от вирусов и мобильных генетических элементов, который превратился в механизм внутренней регуляции активности генов (Matzke, Birchler, 2005; Shabalina, Koonin, 2008; Gutbrod, Martienssen, 2020). Например, в организме человека РНК-интерференция отвечает за контроль таких жизненно важных процессов как рост и пролиферация клеток, дифференцировка тканей, а также образование гетерохроматина. Дисфункция данной системы приводит к развитию сердечно-сосудистых заболеваний, неврологических расстройств и различных типов рака (Макарова, Крамеров, 2007; Lu et al., 2008). У растений и беспозвоночных животных РНК-интерференция остается ключевым элементом противовирусной защиты организма (Макарова, Крамеров, 2007). С момента своего открытия РНКи стала также удобным инструментом для выяснения функций генов, поскольку механизм позволяет надежно подавлять экспрессию гена-интереса и определить его роль. С точки зрения сельского хозяйства,

РНКи, используемая для блокирования экспрессии генов-мишеней различных вредителей и патогенов, имеет большой потенциал в защите растений, сравнимый с другими перспективными стратегиями контроля, например, использованием нейротоксичных инсектицидов. Ожидается, что, в ближайшем будущем, на рынке пестицидов будут представлены следующие категории препаратов на основе РНКи: агенты прямого контроля, ингибиторы факторов резистентности, регуляторы роста насекомых и стимуляторы роста (имитаторы активности фитогормонов) (Taning et al., 2020). Преимуществами препаратов нового типа станут: 1) высокая специфичность за счет нацеливания на конкретный ген конкретного вредителя или близкородственной группы фитофагов, что позволит избежать нецелевых эффектов у остальных участников агробиоценозов (Liu et al., 2020); 2) отсутствие токсичности для человека и объектов окружающей среды благодаря тому, что РНК выступает естественным компонентом живого в широком смысле этого слова и легко подвергается деградации как в пищеварительной системе, так в воде и почве (Dubelman et al., 2014; Albright et al., 2017; De Shutter et al., 2022). Однако данное преимущество служит, несомненно, и слабым местом РНКи как способа защиты растений, поскольку время жизни малых РНК, используемых как химический пестицид, крайне невелико. Способность сохранять устойчивость к действию факторов внешней среды или ферментативной деградации с обеспечением безопасности всех участников агробиоценозов должна быть неразрывно связана с гарантированием эффективности действия будущих препаратов на основе РНК.

В обобщенном виде механизм РНК-интерференции включает в себя две основные составляющие – нуклеазы и направляющую РНК (англ. *guide strand*), которая, как правило, образуется из двуцепочечного предшественника длиной 18–22 п.н. (дцРНК, или РНК-дуплекс) одного из двух типов малых РНК – короткой интерферирующей РНК (англ. *siRNA – small interference RNA, siRNA*, киРНК) или микроРНК (англ. *microRNA, miRNA*, миРНК). Оба типа малых РНК имеют схожие механизмы действия в клетке, отличаются своим происхождением, вторичной структурой и функцией, но каждая из них способна запустить классический путь РНКи в любое время в зависимости от потребностей организма. Будучи эволюционно более поздними, представленными исключительно у Archaeplastida и Unikonta с резким увеличением репертуара генов у двусторонне-симметричных животных со сложным планом строения тела, миРНК регулируют паттерн экспрессии генов собственного организма, в то время как киРНК участвуют в защите организма от чужеродных нуклеиновых кислот и распространены во всех пяти супергруппах эукариот со снижением своей защитной функции у высших позвоночных (Shabalina, Koonin, 2008; Carthew, Sontheimer, 2009; Huntzinger, Izaurralde, 2011; Zotti et al., 2018). В 2006 году сразу у нескольких млекопитающих, включая человека, был открыт третий тип РНК, способный осуществлять подавление (сайленсинг, англ. *silencing*) активности генов и описанный, пока что, только у животных – пиРНК (англ. *piwi-interacting RNA, piRNA, piwiRNA*). Данный тип малых РНК и соответствующий ему регуляторный путь имеют ряд отличительных особенностей, таких как одноцепочечная структура молекулы, взаимодействие с белками подсемейства Piwi, цикл образования вторичных piРНК, или цикл «пинг-понг», а также особая роль в раннем развитии организма, сперматогенезе и защите генома от мобильных элементов (Макарова, Крамеров, 2007). Количество обнаруженных пиРНК у млекопитающих превышает количество других малых РНК и регулируется белками подсемейства PIWI (у *Drosophila melanogaster* – Ago3, Aub и Piwi) – близкими «родственниками» белков Argonaute, образующее вместе единое консервативное семейство. Роль белков PIWI насекомых заключается в поддержании фертильности и развитии гамет, при этом их экспрессия не ограничивается только клетками зародышевой линии (Макарова, Крамеров, 2007). Несмотря на то, что, фактически, РНК-интерференция может быть запущена тремя типами малых РНК, для прикладного использования и научных исследований используется лишь киРНК. Во-первых,

киРНК единственная может иметь экзогенное происхождение и доставляться в клетку из окружающей ее среды. Во-вторых, ее основной механизм действия заключается в деградации комплементарной молекулы мРНК, что позволяет надежно подавлять экспрессию целевого гена (Cooper et al., 2019; Zhu et al., 2020). К настоящему моменту уже достигнуты успехи в разработке РНК-пестицидов различными исследовательскими группами как на базе университетов, так и отделами R&D крупнейших биотехнологических компаний. Сразу несколько продуктов на основе РНКи находятся на стадиях активной коммерциализации и проходят процедуру регистрации у государственных регуляторов. Наибольших успехов достигли компании Bayer и GreenLight Biosciences, работающие сразу над несколькими пестицидами. Последняя в конце прошлого года представила успешный отчет о разработке препарата Ledprova, направленный на борьбу с колорадским жуком, который сейчас находится на стадии регистрации (Rodrigues et al., 2021). Компания Bayer уже в настоящем году планирует коммерческое внедрение трансгенной технологии SmartStax Pro на территории США (SmartStax® PRO Technology ...). По мимо этого, обе компании разрабатывают продукты, предназначенные для борьбы с паразитом медоносных пчел — клещем *Varroa* sp. GreenLight анонсирует регистрацию своего продукта на I квартал этого года, в то время как Bayer, по состоянию на 2019 год, заявила об ограниченном успехе своей разработки (GreenLight Biosciences...; Gene-Silencing...). Неизвестен статус проектов компаний BASF, RNAiSSANCEAg и Syngeta, разрабатывающие продукты для местного применения для борьбы с возбудителем фузариоза, капустной молью и колорадским жуком (Gene-Silencing...). Израильская компания Viaqua Therapeutics, занимающаяся изучением заболеваний различных аквакультур, разрабатывает свой первый продукт, предназначенный для борьбы с вирусом синдрома белых пятен, поражающим креветок. Представители компании заявляют, что смогли преодолеть проблемы, связанные с нестабильностью РНК в водной среде и деградацией в пищеварительной системе, и в ближайшее время планирует запуск производства пищевой добавки на основе РНК (Gene-Silencing..., Ufaz et al., 2018).

Данный обзор обобщает опыт использования РНК-интерференции в защите растений от насекомых-вредителей, представляет последние данные о механизме РНК-интерференции и современных способах доставки дцРНК в организм насекомых.

Механизм РНК-интерференции

Ни один из трех типов РНК, запускающих РНКи, сам по себе не способен к деградации комплементарной ему матричной РНК и, по сути, представляет собой лишь компонент, направляющий белковый комплекс. Все малые РНК работают в составе рибонуклеопротеинового комплекса, названного РНК-индуцированным комплексом сайленсинга гена, или RISC (англ. *RNA-induced silencing complex*) (Kobayashi, Tomari, 2016; Zhu, Palli, 2020). Минимальный комплекс, способный к деградации мРНК, включает в себя белок семейства Argonaute, роль которого заключается в связывании малой РНК и расположении ее в конформации, облегчающей распознавание мРНК и

собственно молекулу РНК. Белки Argonaute могут осуществлять подавление экспрессии либо за счет собственной эндорибонуклеазной активности (например, белок Ago2 у *D. melanogaster* и млекопитающих), либо за счет привлечения дополнительных белковых факторов, которые опосредуют репрессию трансляции, деаденилирование и/или распад мРНК (например, белки Ago1, Ago3, и Ago4 у млекопитающих) (Meister et al., 2004; Liu et al., 2004; Ameres, Zamore, 2013). Сборке RISC-комплекса в цитоплазме предшествует этап образования РНК-дуплексов при помощи белков Dicer (Dcr у *D. melanogaster*) и дцРНК-связывающих белков, который одинаков по

своему механизму, но отличается у насекомых составом белков-участников для киРНК (Dcr-2 и R2D2) и миРНК (Dcr-1 и Loq) (Provost et al., 2002; Lee et al., 2004; Pham et al., 2004; Saito et al., 2005). Белок Dicer относится к семейству эндорибонуклеаз III и обладает высокой специфичностью к длинным двуцепочечным молекулам РНК, которые расщепляет на множество коротких фрагментов длиной 18–22 п.н. с двумя неспаренными нуклеотидами на 3'-концах дуплекса. Комплекс дуплекса малой РНК с белком Argonaute, иногда, называют pre-RISC (Kobayashi, Tomari, 2016; Song, Rossi, 2017).

Помимо образования коротких РНК-дуплексов, у насекомых белок Dicer выполняет еще несколько важных функций, в частности, облегчает связывание РНК-дуплекса с белком Argonaute и помогает определить, какая из двух цепей дуплекса останется в качестве направляющей цепи, а какая станет сопутствующей (англ. *passenger strand*) и подвергнется элиминации (Kobayashi, Tomari, 2016). Для загрузки РНК-дуплекса на белок Argonaute у животных и растений требуется энергия гидролиза АТФ, который обеспечивается целым рядом белков шаперонов и ко-шаперонов, образующих комплекс Hsc70/Hsp90. В частности, для белка Ago2 *D. melanogaster* данный комплекс включает шапероны Hsc 70-4 и Hsp83 (гомолог Hsp90), а также ко-шапероны Hop, Droj2 и p23 (Khvorova et al., 2003; Iwasaki et al., 2011; Iwasaki et al., 2015). Считается, что Hsc70/Hsp90 изменяют конформацию белка Argonaute и снижают энергию активации для связывания с дцРНК за счет гидролиза АТФ до тех пор, пока белок не встретится с молекулой дцРНК. В ходе дальнейшего созревания RISC в котором происходит определение направляющей и сопутствующей цепей РНК с элиминацией из рибонуклеинового комплекса последней происходит и стабилизация всего комплекса, соответствующая наименьшей энергии энергетической кривой (Schirle, MacRae, 2012; Kobayashi, Tomari, 2016;). Таким образом, для сборки RISC и загрузки дуплекса киРНК на белок Ago2 *D. melanogaster* требуется дополнительно комплекс Hsc70/Hsp90 и комплекс Dcr2/R2D2. Комплекс шаперонов обеспечивает связывание Dcr2/R2D2/киРНК с белком Ago2 и увеличивает его время пребывания в связанном состоянии для полноценной загрузки РНК-дуплекса. Основным фактором, определяющим выбор направляющей цепи, служит относительная термодинамическая стабильность двух концов дуплекса; цепь, несущая термодинамически менее стабильную пару оснований на своем 5'-конце, в дальнейшем действует как направляющая цепь. При сборке Ago2-RISC мух *D. melanogaster* термодинамическая асимметрия сначала распознается RISC-загрузочным комплексом (англ. *RISC-loading complex (RLC)*), состоящим из белка Dcr-2 и дцРНК-связывающего белка R2D2. R2D2 связывается с более стабильным концом дуплексов, в то время как Dcr-2 остается на менее стабильном конце, определяя полярность дуплексов малых РНК. Помимо своей роли в выборе направляющей цепи, RLC важен для связывания дуплекса РНК и Ago2 у насекомых, но не у млекопитающих (Liu et al., 2003; Liu et al., 2006; Tomari, Zamore, 2007; Kobayashi, Tomari, 2016).

Полное созревание RISC включает этапы расклинивания РНК-дуплекса и элиминацию сопутствующей цепи. На этапе расклинивания первостепенное значение имеет

N-домен белка Argonaute, поскольку именно эта часть белковой молекулы как бы вклинивается между цепями РНК-дуплекса и «отцепляет» несколько пар оснований на 3'-конце направляющей цепи (Kobayashi, Tomari, 2016). Созревание завершается элиминацией сопутствующей цепи из белка Argonaute, либо путем разрезания сопутствующей цепи за счет собственной рибонуклеазной активности (характерно для киРНК), либо за счет медленного разделения двух цепей (характерно для миРНК), в котором большую роль играет так называемый PAZ-домен белка Ago. Данный домен фиксирует 3'-конец направляющей цепи после расклинивания, что способствует дальнейшему разделению двух цепей (Matranga et al., 2005; Rand et al., 2005). Кроме того, ряд малых РНК насекомых (киРНК) и растений (киРНК и миРНК) подвергаются 2'-О-метилированию 3'-конца только направляющей или обеих цепей дуплекса с помощью метилтрансферазы Hen1. Считается, что метилирование стабилизирует и защищает малые РНК от преждевременной деградации (Horwich et al., 2007; Ameres et al., 2011).

Канонический путь РНК-интерференции с участием экзогенной киРНК (рис. 1) заканчивается направлением RISC-киРНК к комплементарной мРНК-мишени, которая деградирует. Деградацию мРНК опосредует как собственная эндонуклеазная активность PIWI-домена белка Ago2 – внесение точного «разрыва» между основаниями мРНК комплементарными 10 и 11 нуклеотиды (с 5'-конца) киРНК, так и внешние клеточные экзонуклеазы, которые заканчивают процесс деградации образовавшихся фрагментов. При неполной комплементарности своей мишени киРНК может инициировать образование гетерохроматина в соответствующем гену локусе хромосомы или осуществить репрессию трансляции (транскрипционный и посттранскрипционный сайленсинг гена соответственно) (Tomari, Zamore, 2005; Orban, Izaurralde, 2005). В данном обзоре не рассматривается детально микро-РНК зависимый сайленсинг, но следует упомянуть, что в отличие от киРНК, основным механизмом подавления считается репрессия трансляции, которая может быть дополнена деградацией мРНК в случае полной комплементарности (Brodersen et al., 2008; Carthew, Sontheimer, 2009). Показано, что белки Ago часто связаны с внутриклеточными мембранами ЭПР и аппарата Гольджи, что предполагает наличие определенных субклеточных компартментов, необходимых для эффективного сайленсинга. Возможно, эти компартменты включают в себя Р-тельца, которые накапливают неактивные мРНК, а также различные нуклеазы (Cikaluk et al., 1999; Pillai et al., 2005).

Вопрос о поглощении дцРНК клетками кишечника и распространении по всему организму до сих пор остается открытым и нет единого мнения о том, какие именно механизмы обуславливают данный процесс у различных групп насекомых. В настоящее время предполагается участие пассивного транспорта посредством Sid-like белков (SIL), клатрин-зависимого эндоцитоза и макропиноцитоза. В системном распространении ответа РНКи могут быть задействованы структуры подобные нанотрубкам (у *D. melanogaster*), везикулярный транспорт с участием гемоцитов и белки SIL. Защита дцРНК в полостях тела и гемолимфе может быть обусловлена различной активностью дцРНКаз, которая отличается у разных видов и

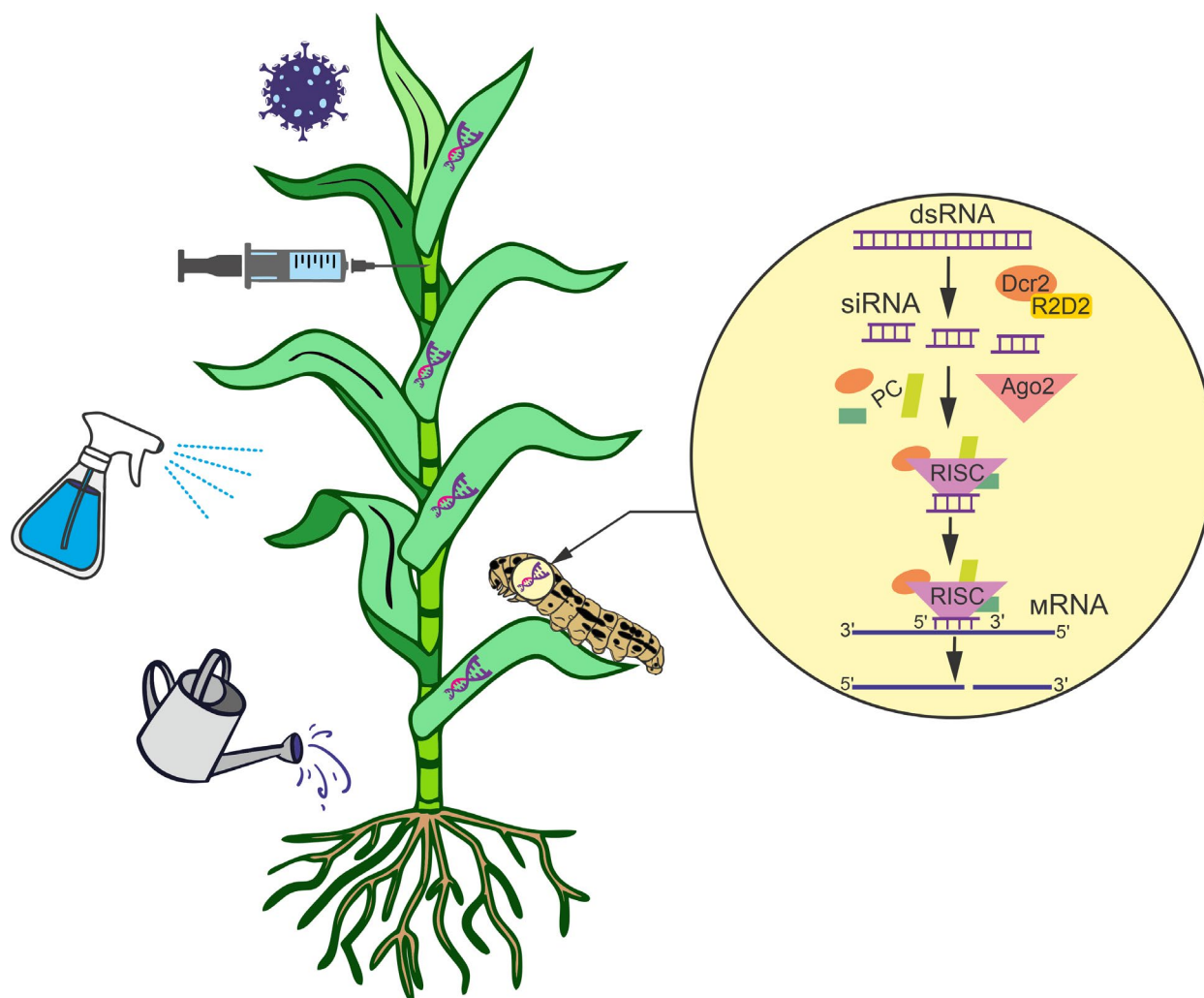


Рисунок 1. Нетрансгенные методы доставки РНК-пестицидов (см. далее) в организм насекомых-вредителей (слева) и механизм РНК-интерференции (справа), индуцированный экзогенной двуцепочечной РНК (dsRNA).

Проглоченная дцРНК достигает клеток эпителия кишечника насекомого, где процессируется до короткой интерферирующей РНК (siRNA), которые связываются с белком Ago2 и рядом вспомогательных белков (PC) с образованием комплекса RISC (индуцированный РНК комплекс сайленсинга), который распознает комплементарную к РНК мРНК-мишень (mRNA) и вызывает ее деградацию

Figure 1. Non-transformative delivery methods of RNA pesticides (see below) to insect pests (left) and the RNA interference mechanism (right) induced by exogenous dsRNA. Ingested dsRNA reaches the insect intestinal epithelial cells, where it is processed to siRNAs, which bind to Ago2 and several accessory protein components (PC) to form a RISC that recognizes the complementary siRNA of the target mRNA and causes its degradation

может иметь тканеспецифичный характер, различным уровнем pH, определяющий как стабильность самих молекул, так и активность ферментов. Есть мнение, что

белки липофорины, могут связывать дцРНК и защищать их от преждевременной деградации (Cooper et al., 2019; Zhu et al., 2020).

РНК-интерференция в защите растений. Методы доставки дцРНК

РНК-интерференция находит все большее применение в области защиты растений как от патогенов, так и от вредителей (Andrade, Hunter, 2016; Zotti et al., 2018). дцРНК служит ключевым элементом всего механизма и закономерно возникают вопросы о путях производства действующего вещества и создании форм препаратов, позволяющих им достигнуть места действия. В настоящее время источником дцРНК может быть либо само растение, вырабатывающее дцРНК (HIGS, или трансгенный подход), либо *in vitro* или *in vivo* полученная дцРНК напрямую доставляется до вредителя в ходе его питания на растении или через его покровы (SIGS, или нетрансгенный подход). Последняя стратегия отличается разнообразием форм и

включает микроинъекции, опыление и полив культур, замачивание корней, обработку семян и введение дцРНК в ствол, которые могут быть модифицированы дополнительным использованием липосом, наночастиц, бактерий и вирусов для облечения доставки и сохранения стабильности дцРНК в окружающей среде или в пищеварительном тракте насекомых (Zhu, Palli, 2020; Liu et al., 2020). Стоит заметить, что не все из перечисленных методов подходят для использования в поле (микроинъекции, замачивание), но хорошо себя зарекомендовали для проведения биотестов по защите растений в лабораторных условиях (Turner et al., 2007; Andrade, Hunter, 2016; Andrade, Hunter 2017).

Трансгенный подход, или сайленсинг гена, индуцируемый растением-хозяином (HIGS)

Несмотря на неприятие ГМО обществом и пристальное внимание к технологии со стороны контролирующих органов, использование трансгенных растений, в настоящее время, единственный пример успешного применения защиты растений от насекомых-вредителей при помощи РНКи в полевых условиях, который доступен для применения и представлен в некоторых странах (Bolognesi et al., 2012; Head et al., 2017; SmartStax® PRO Technology...). Стратегия HIGS (англ. *Host-induced gene silencing*) подразумевает использование трансгенных культур, которые самостоятельно продуцируют дцРНК, которая(-ые) комплементарны транскриптам ключевых генов в организме вредителя. Подход реализован в отношении различных вирусных патогенов и некоторых насекомых. Насекомое, питаясь на растении, поглощает и дцРНК, которые, проходя через просвет кишечника, поступают в клетки кишечного эпителия и далее в гемолимфу. Распространяясь с гемолимфой и проникая через клеточные мембраны клеток тканей, которые она омывает, дцРНК запускают системный ответ и подавляют экспрессию гена в различных органах и тканях (Nowara et al., 2010; Baulcombe, 2015; Liu et al., 2020).

Компания Bayer последнее десятилетие занимается разработкой технологии с использованием РНК-интерференции. Первым успешным продуктом стал SmartStax® PRO, представляющим собой сорт ГМ-кукурузы, несущей ряд генов эндотоксинов и ген *DvSnf7*, кодирующий дцРНК к гену *snf7* западного кукурузного жука (*Diabrotica virgifera*). *SNF7* (белок неферментирующий сахарозу 7) это ключевой белок эндосомного сортировочного комплекса ESCRT III, который принимает участие в регуляции процесса клеточного деления, транспорте, сортировке и лизосомной деградации клеточных белков. Аномальный процесс деления клеток и нарушение деградации белков приводит к апоптозу и гибели насекомого. Технология с использованием *DvSnf7* снижает появление *D. virgifera* примерно на 80–95% и значительно уменьшает повреждение корней. Отсутствие перекрестной резистентности между *DvSnf7* и δ -эндотоксином *Cg3Bb1*, входящий в этот же продукт, позволяет успешно использовать данную культуру в популяциях *D. virgifera*, проявляющих устойчивость к *Cg3Bb1*. В 2021 году технология получила сертификат безопасности для импорта и использования пищевых продуктов министерства сельского хозяйства КНР, что позволяет запустить применение технологии в 2022 году в США, а в 2023 – в Канаде. В планах компании расширение технологии на культуры хлопка и сои (Bolognesi et al., 2012; Head et al., 2017; SmartStax® PRO Technology...). Другой многообещающий стартап, также реализуемый в США, – RNAiSSANCE Ag LLC, запущенный компанией TechAccel. Основная цель проекта – разработка распыляемых РНК-пестицидов на базе патентованной платформы для сельского хозяйства и ветеринарии. В планах компании – снижение стоимости производства дцРНК до 1–2 долларов США за грамм (RNAi pesticides target...). Компания предлагает использование и трансгенного подхода, например, для защиты культуры табака от ряда чешуекрылых вредителей (Taning et al., 2020; TechAccel...).

К настоящему моменту большая часть примеров использования HIGS стратегии в защите растений находится на стадии исследований или ранних полевых испытаний. Abdellatef с соавторами успешно показали, что подавление гена *shp* у зерновой тли *Sitobion avenae*, питающейся на линии трансгенного ячменя, экспрессирующего двуцепочечную РНК приводит к значительному снижению уровня экспрессии гена, которое сохраняется и передается потомству на протяжении 7 поколений. Данный ген кодирует белок SHP, который участвует в затвердевании гелеобразной слюны и формировании слюной оболочки, которая обеспечивает непрерывность и безопасность питания насекомого. Кормление насекомых на нескольких линиях трансгенного ячменя на протяжении 2 недель вызвало уменьшение размеров слюной оболочки на 81%, что, как и предполагалось, оказало влияние на эффективность питания и репродуктивную систему насекомого. В ходе эксперимента наблюдалась задержка развития и снижалась выживаемость взрослых тлей (Abdellatef et al., 2015). Трансгенные линии табака, экспрессирующие дцРНК для подавления экспрессии гена *v-ATФазы А* табачной белокрылки (*Bemisia tabaci*), смогли снизить уровень соответствующих транскриптов в организме вредителя и привести к его гибели после питания на трансгенных растениях. Вакуолярная АТФаза представляет собой протонный насос, расположенный в мембранах различных клеточных компартментов, и широко распространена у эукариот, отвечая за многие жизненно важные функции, в том числе регуляцию биохимических процессов в клетке – создание кислого рН и обеспечения работы гидролитических ферментов, деградация белков, вторичный транспорт и др. Этот фермент может выступить одной из неспецифических мишеней, которая позволит воздействовать на различные группы насекомых (Кирпичникова и др., 2016; Thakur et al., 2014). Испытания трансгенных линий хлопчатника, подавляющих экспрессию гена спиртообразующей ацил-КоА редуктазы клопа *Adephocoris suturalis*, продемонстрировали сокращение популяции вредителя совместно с развитием устойчивости растений к наносимым повреждениям (Luo et al., 2017).

Растения, как упоминалось ранее, также обладают собственным механизмом РНКи, который способен процессировать трансгенные длинные РНК-дуплексы до кРНК длиной около 21 п.н.. При этом для запуска эффективной РНКи длина экзогенной дцРНК, поглощенная клеткой насекомого, должна составлять не менее 60 п.н.. Таким образом, процессирование дцРНК самим растением способно ограничивать эффективность HIGS подхода в борьбе с насекомыми-вредителями, не позволяя дцРНК накапливаться в растительной ткани в достаточном количестве. Коллеги из института Макса Планка преодолели данную проблему используя трансплантомные линии картофеля. Трансформация хлоропластов, имеющих прокариотическое происхождение и не обладающих функциональным аппаратом РНКи, позволила сохранить дцРНК от процессирования растительной нуклеазой *Dicer* и сравнить эффективность трансгенных и трансплантомных линий картофеля в подавлении экспрессии генов *b*-актина и белка *Snf7* колорадского жука. Питание личинок первого возраста в течение 9 дней показало, что наибольшей инсектицидной активностью обладали именно трансплантомные

растения, экспрессирующие дцРНК к β -актину, и которые вызывали 100% гибель насекомых уже на 5 день. Ни одно из трансгенных растений картофеля не вызывало гибели личинок, но замедляло их рост. Авторы сделали вывод, что короткие малые РНК, скармливаемые насекомым, имеют незначительный или вовсе отсутствующий сайленс-эффект (Zhang J et al., 2015).

Нетрансгенные стратегии, или спрей-индуцированный сайленсинг гена (SIGS)

Альтернативой трансформационной стратегии и использованию ГМ-растений служит спрей-индуцированный сайленсинг гена, или SIGS (англ. *spray-induced gene silencing*), в котором дцРНК, полученная химическим синтезом или биотехнологическим путем, используется в качестве прямого (опрыскивание растений, протравливание семян) или косвенного (орошение, замачивание корней) агента контроля. Несмотря на то, что локальное нанесение малых и двуцепочечных РНК на поверхность растений применяли и ранее, устоявшееся название подход получил лишь недавно. В 2016 году Koch с соавторами использовали некодирующую дцРНК комплементарную транскриптам трех ланостерол С-14 α -деметилаз фитопатогенного гриба *Fusarium graminearum* и показали, что спрей-индуцированный сайленсинг не только эффективен при локальном нанесении дцРНК, но оказывает и системное действие в необработанных частях растения. (Koch et al., 2016). Наблюдая снижение стоимости производства дцРНК и многообещающие результаты многочисленных исследований стабильности и эффективности действия антисмысловых РНК, можно предположить, что именно эта стратегия применения РНК-интерференции в защите растений будет развиваться в будущем наиболее интенсивно (Zotti et al., 2018; Taning et al., 2020). Поскольку подход не предполагает внесения наследуемых изменений в геном, можно также ожидать, что коммерческие продукты на его основе не будут подвергаться столь длительным процедурам тестирования и одобрения как ГМ-культуры (Cagliari et al., 2019).

Обработка листьев

Использование распыления и локального нанесения – один из наиболее популярных методов доставки малых РНК в рамках SIGS-стратегии. На сегодня проведены исследования среди различных групп вредителей, включая сосущих насекомых и клещей. Одни из первых работ, которые показали, что успешный нокдаун целевого гена путем пероральной доставки дцРНК возможен, были проведены на триатомовом клопе *Rhodnius prolixus* и бабочке *Epiphys postvittana*, интродуцированной из Австралии. Особенность данных исследований заключается в анализе подавления генов на уровне транскриптов и акцент на функциональную генетику, а не на прикладное применение (Araujo et al., 2006; Turner et al., 2006).

Для исследований же последних лет в области РНК-пестицидов характерен фокус на биологических тестах, вопросах системности распространения РНК-молекул, разнообразии вредителей и их способности поглощать малые РНК и отвечать на них, установлении зависимости «доза-эффект». В одной из последних работ, посвященной борьбе с колорадским жуком, использовались личинки II возраста для оценки эффективной концентрации дцРНК

и транскрипты гена актина в качестве целевой мишени. Кормление личинок листьями картофеля с нанесенной дцРНК в количестве 5 мкг на лист вызвало эффективное ингибирование роста и последующую гибель личинок, которая достигала 96%. Помимо этого, авторы, используя дцРНК различной длины смогли показать, что биологическая активность актин-дцРНК обратно пропорциональна ее длине – наибольшая смертность наблюдалась у личинок, которые питались дцРНК размером около 250–300 п.н. ДцРНК размером 50–100 п.н. не приводили к гибели насекомых. Стабильность дцРНК под воздействием внешних условий – крайне важная характеристика будущего РНК-пестицида, позволяющая перейти к масштабированию производства и полевым испытаниям. В ходе данной работы было установлено, что нанесенная дцРНК не смывается с листьев и в значительных количествах сохраняется на протяжении четырех недель. В случае интенсивного воздействия ультрафиолетового излучения актин-дцРНК теряла свою биологическую активность через 30 минут, что накладывает ограничения на применение в поле, но оставляет возможность применения в условиях защищенного грунта (Miguel, Scott, 2016).

Стабильность молекул и доставка РНК до вредителя может стать краеугольным камнем в вопросе эффективности РНК-интерференции. Существующие в настоящее время решения включают использование неорганических наночастиц и липосом. Связывание молекул РНК с внешней или внутренней поверхностью наночастиц позволяет защитить дцРНК от пагубного воздействия как внешней, так и внутренней среды и способствует успешному поглощению насекомыми. Zhang с коллегами показали возможность подавления экспрессии генов хитозан синтазы и семафорина-1 (сигнального белка, регулирующего процесс формирования аксонов, регуляции иммунитета и ангиогенеза) у комаров *Anopheles gambiae* и *A. aegypti* соответственно в комплексе дцРНК-хитозан. (Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2015; Battistini, Tamagnone, 2016). Известно, что эффективность РНК-интерференции варьирует у различных отрядов насекомых. Менее чувствительны к экзогенной дцРНК чешуекрылые и прямокрылые благодаря наличию у них дцРНК рибонуклеаз или низкому уровню экспрессии генов пути РНК-интерференции, что обуславливает неэффективность преобразования уже захваченных клеткой молекул (Yoon et al., 2017). Флюоресцентные наночастицы в комплексе с дцРНК способны вызывать уменьшение размера и гибель личинок азиатского кукурузного мотылька *Ostrinia furnacalis* при кормлении обработанными листьями (He et al., 2013). Многообещающий результат был продемонстрирован Zheng совместно с коллегами в снижении плотности популяции зеленой тли (*Aphis glycines*) путем трансдермальной доставки дцРНК, в составе наночастиц и детергента. Разработанный авторами состав эффективно преодолевал наружные покровы и проникал в гемоцель, где распределялся по различным тканям в течение 1 часа. Гемоцитин-дцРНК мощно подавляла экспрессию целевого гена (95.4%) при сокращении плотности популяции тли на 80% (Zheng et al., 2019).

Преодоление наружных покровов насекомых возможно и с использованием липосом. Так в недавней работе было показано, что дцРНК к гену рибосомального белка P0, заключенная в липосомальную оболочку может выступать в

качестве потенциального противоклещевого агента – инкубация клещей *Rhipicephalus haemaphysaloides* привела к снижению скорости линьки, нарушению кормления и размножения (Zhang et al., 2018). Широкое применение в полевых условиях может найти совместная разработка Квинслендского альянса сельскохозяйственных и пищевых инноваций (QAAFI) и Австралийского института биоинженерии и нанотехнологий (AIBN), названная «BioClay» и представляющая собой наночастицы гидротальцита, которые хорошо связывают дцРНК за счет противоположных зарядов молекул. Распыление подобной смеси демонстрирует защиту от воздействия воды и способствует замедленному высвобождению дцРНК, которая может быть обнаружена на обработанных листьях спустя 30 дней. К сожалению, данная технология была апробирована лишь в защите растений табака и гороха от вирусных инфекций (Mitter et al., 2017; Worrall et al., 2019), но вполне вероятно, что она окажется эффективной и для ограничения численности вредных членистоногих.

Среди коммерческих продуктов на основе РНК, появление на рынке которых ожидается в ближайшем будущем, стоит упомянуть технологию «BioDirect» компании Bayer, для которой уже анонсирован широкий спектр применения: защита медоносных пчел от клещей *Varroa* sp., борьба с вредителями сельскохозяйственных культур и сорными растениями, устойчивыми к гербицидам. Компания Syngenta (ChemChina), которая приобрела бельгийскую фирму Devgen, также разрабатывает пестициды на основе РНК против различных наземных и почвенных насекомых-вредителей (Taning et al., 2020).

Важный момент для коммерческого успеха препаратов на основе дцРНК – развитие устойчивости и пути ее преодоления. На настоящий момент собрано не так много информации, задокументирован единственный случай развития резистентности в естественной популяции колорадского жука CEAS 300. Резистентность более чем в 11 000 раз к дцРНК, нацеленной на ген субъединицы А вакуолярной АТФазы, выработалась в результате девяти раундов селекции с использованием распыления на листья (Mishra et al., 2021). Предполагается, что в развитии резистентности может быть задействован неспецифический механизм, обусловленный нокдауном белка StauC. Это один из дцРНК-связывающих белков, подобного белку Loq *D. melanogaster* и задействованным в инициации пути РНКи у жесткокрылых. Снижение экспрессии StauC более чем в два раза в культуре клеток колорадского жука Lepd-SL1RR подавило процессирование дцРНК до кРНК более чем на 80% (Yoon et al., 2018).

Интъекции в ствол и полив

Полив и внутриводольные интъекции – еще один из подходов *in planta*, позволяющий косвенно воздействовать на вредителя и обеспечивающий системность малых РНК в организме растения за счет их поступления и распространения через проводящую систему. Данный подход можно условно разделить на два в зависимости от метода введения пестицида и основной ткани, вовлеченной в распространение. Полив и орошение подразумевают доставку малых РНК через корневую систему и далее с восходящим током по ксилеме в надземную часть растения. Интъекция

в ствол обеспечивает распространение РНК как по ксилеме, так и по флоэме и проникновение её во все органы растения, включая корни. Хотя интъекции в ствол могут быть применены исключительно к древесным культурам, данный метод, за счет вовлечения обоих типов проводящих тканей позволяет воздействовать на более широкий спектр вредителей, включая как сосущих, так и грызущих. Одна из первых работ, использующих данный подход, продемонстрировала свою эффективность в отношении трех видов полужесткокрылых вредителей (*Diaphorina citri*, *Bactericera cockerelli* и *Homalodisca vitripennis*) при поливе и интъекциях в ствол цитрусовых культур и винограда. Двучечечная РНК, специфичная к транскрипту гена аргининкиназы, сохраняла стабильность в растениях мексиканского лайма в течение 7 недель после однократной обработки (2 г очищенной дцРНК на 15 л воды) (Hunter et al., 2012).

Интересный метод доставки дцРНК был предложен Dalakouras и коллегами (Dalakouras et al., 2018) – через черешок листа. К черешку удаленного листа присоединяли емкость с раствором РНК, который поглощался растением. Эксперимент продемонстрировал, что попавшая таким путем в растение дцРНК накапливается в апикальных листьях постепенно, достигая максимума на 10 день после обработки, в то время как интъекция в ствол позволяет ей быстро распространиться по растению (максимум содержания на 1-ый день после обработки) и так же быстро деградировать. Кроме преимущества предложенного метода, авторы смогли выяснить, что поглощение и распространение молекул РНК было опосредовано сосудами ксилемы и апопластическим транспортом.

Внутриводольные интъекции хорошо подходят для садовых культур и для борьбы с насекомыми, питающимися на корнях или вредителями древесины. Для облегчения процедуры интъекций уже существуют коммерческие системы, например Arborjet®, позволяющие быстро и с наименьшим уроном для дерева ввести препарат (Joga et al., 2016). Использование дцРНК при поливе или орошении удобно в использовании, но ограничивается скоростью деградации дцРНК в почве, которая влияет на эффективность РНК-интерференции (Dubelman et al., 2014; Joga et al., 2016).

Использование малых РНК в качестве средств защиты растений подразумевает и решение вопроса их получения в производственных масштабах. Химический синтез и очистка представляются дорогостоящими. Альтернативой в этой ситуации служит биотехнологическое производство – экспрессия дцРНК в бактериальных культурах. Ряд исследований доказали эффективность использования дцРНК, полученной в *Escherichia coli*, при кормлении личинок и имаго различных вредителей (Zotti et al., 2018; Joga et al., 2016; Li et al., 2011; Ahn et al., 2019). По всей видимости данный подход используется коммерческими компаниями, испытывающими дцРНК. В частности, об использовании микробной системы сообщает ранее упоминавшаяся компания RNAiSSANCE Ag LLC. Более того, было показано, что выделение дцРНК из бактерий не обязательно, возможно использование бактериальной суспензии для пероральной доставки и запуска РНК-интерференции (Zhu et al., 2011; Ganbaatar et al., 2017; Ai et al., 2018).

Вирус-индуцированный сайленсинг генов (VIGS)

Фитопатогенные вирусы способны самостоятельно запускать механизм РНК-интерференции в растительной клетке, которая обеспечивает естественную систему противовирусной защиты растения (Максимов и др., 2021; Sasaya et al., 2013). Вместе с тем непатогенные штаммы можно использовать в качестве векторов для доставки и запуска дцРНК в растении для защиты от насекомых-вредителей (Cagliari et al., 2019). Вирус-индуцированный сайленсинг генов (англ. VIGS, *virus-induced gene silencing*) уже сейчас широко применяется в функциональной геномике растений. Он имеет высокий потенциал в прикладном использовании, поскольку обладает рядом преимуществ таких как высокая эффективность, в том числе за счет того, что многие фитопатогенные вирусы имеют РНК-геном. VIGS не приводит к изменениям в геноме самого растения, а трансформация имеет временный характер. Тем не менее эффект может передаваться в поколениях и характеризуется системностью (Baulcombe, 2015). Однако вопрос принятия данной системы развития устойчивости обществом по аналогии с ГМ-продуктами остается открытым и может быть серьезным препятствием при использовании в промышленном растениеводстве. Классическое применение данного подхода подразумевает вирусную трансформацию самих растений, наработку дцРНК и поглощение ее вредителем в ходе питания. Так успешное получение рекомбинантного вектора на основе вируса тристеза цитрусовых (CTV) позволило повысить смертность и снизить способность к полету имаго азиатской цитрусовой листоблошки *D. citri* за счет деформации крыльев. Данный вид псиллид служит основным переносчиком бактерий рода *Liberibacter* sp., которые вызывают пожелтение цитрусовых, или «болезнь желтого дракона» (Hajeri et al., 2014). Другой пример применения VIGS – получение вектора на основе вируса X картофеля (PVX), несущего фрагменты гена вакуолярной АТФазы и гена, ответственного за синтез бурсикона у хлопкового мучнистого червеца *Phenacoccus solenopsis*. Биотесты, проведенные на растениях табака, показали, что особи, питающиеся на обработанных растениях, либо погибли, либо их имаго имели серьезные патоморфологические изменения (Khan et al., 2018).

В последние десятилетия значительное развитие получили исследования виroma насекомых как за счет развития технологий высокопроизводительного секвенирования, так и благодаря внедрению биоинформатических подходов и компьютерных приложений (Bonning, 2020; Nouri et al.,

2018). Использование энтомопатогенных вирусов может служить альтернативой стратегии *in planta* и позволит напрямую доставлять эффекторы РНК-интерференции в организм вредителя и крайне перспективно для использования на видах, невосприимчивых к поглощению экзогенной дцРНК. Исследование способности рекомбинантного Флокхауса вируса (FHV) напрямую подавлять активность генов-мишеней в культуре клеток S2 и у имаго *D. melanogaster* показало снижение уровня транскриптов более чем на 70% и высокую смертность по сравнению с вирусом дикого типа (Taning et al., 2018).

Недостатком применения фито- или энтомопатогенных вирусов для запуска РНКи может стать их способность кодировать супрессоры РНК-интерференции, которые служат естественными компонентами преодоления противовирусной защиты организма-хозяина, особенно это характерно для вирусов растений. Альтернативой классическим вирусным векторам могут служить вирусоподобные частицы (VLP), которые представляют собой белковый капсид, несущий фрагмент гена для инициации экспрессии дцРНК и запуска пути РНК-интерференции (Kolliopoulou et al., 2017). VLP могут нарабатываться в микроорганизмах и обладают способностью к самосборке, что позволяет интегрировать дцРНК внутри частицы при их совместной экспрессии в бактериальных клетках (Hoffmann et al., 2016). Данная система способна обеспечить эффективное клеточное поглощение и защиту дцРНК во внеклеточной среде насекомого, но лишена недостатков классических вирусных векторов (Christiaens et al., 2020).

Сайленсинг гена,

опосредованный симбиотическими организмами

Стратегия, имеющая много общего с использованием рекомбинантных энтеробактерий в составе спреев. Рекомбинантные штаммы симбиотических бактерий способны индуцировать устойчивую РНКи в организме насекомого-мишени и обеспечить еще большую специфичность действия за счет особенностей взаимоотношений в системе «симбионт-хозяин». В исследовании Whitten с соавторами (Whitten et al., 2016) демонстрируется подавление экспрессии гена альфа цепи тубулина западного цветочного трипса (*Frankliniella occidentalis*) при помощи энтеробактериального штамма *F. occidentalis* BFo2. Дефицитные по РНКазе III бактерии-симбионты вводили насекомым различных возрастов с помощью искусственного питательного раствора. Наибольшая смертность, вызванная симбионт-опосредованной РНКи, наблюдалась среди личинок первого возраста в течение четырех дней после введения симбиотов.

Заключение

Технология РНКи в борьбе с вредителями начинает внедряться в практику растениеводства, не ограничиваясь исключительно теоретическими исследованиями. Существенным препятствием для его масштабного применения остаются вопросы синтеза эффекторов пути РНКи, а главное сохранения их стабильности в окружающей среде и организме растений и вредителей в зависимости от способа доставки. Помимо этого, придется считаться с тем, что не все насекомые восприимчивы к РНКи. Эффективность данной технологии может отличаться у представителей разных отрядов, семейств и даже родов. Это ставит перед исследователями ещё одну серьезную задачу в области исследования механизмов поглощения и метаболизма малых

РНК у насекомых – выяснение наиболее восприимчивых стадий жизненного цикла и особенностей физиологии, которые могут оказывать влияние на эффективность ответа и трансгенерационные эффекты. Несмотря на очевидное с научной точки зрения отсутствие токсичности для нецелевых объектов, технология управления активностью генов может также вызвать непонимание и неприятие со стороны общества. Тем не менее, нет сомнений в том, что благодаря своей доказанной эффективности, не только в отношении членистоногих вредителей, но и различных фитопатогенов, пестициды на основе малых РНК уже в скором времени существенно обогатят арсенал средств и способов защиты растений.

Библиографический список (References)

- Кирпичникова АА, Чень Т, Романюк ДА, Емельянов ВВ и др (2016) Особенности регуляции вакуолярной H⁺-АТФазы растительных клеток. *Biological Communications* 3(2):149–160. <https://doi.org/10.21638/11701/spbu03.2016.212>.
- Макарова ЮА, Крамеров ДА (2007) Некодирующие РНК. *Биохимия* 72(11):1427–1448.
- Максимов ИВ, Шеин МЮ, Бурханова ГФ (2021) РНК-интерференция в защитных системах растений. *Физиология растений* 68(4):356–370.
- Ahn SJ, Donahue K, Koh Y, Martin RR et al (2019) Microbial-Based Double-Stranded RNA Production to Develop Cost-Effective RNA Interference Application for Insect Pest Management. *Int J Insect Sci* <http://doi.org/10.1177/1179543319840323>
- Ai X, Wei Y, Huang L, Zhao J et al (2018) Developmental control of *Helicoverpa armigera* by ingestion of bacteria expressing dsRNA targeting an arginine kinase gene. *Biocontrol Sci Technol* 28: 253–267 <http://doi.org/10.1080/09583157.2018.1441368>
- Albright VC, Wong CR, Hellmich RL, Coats JR (2017) Dissipation of double-stranded RNA in aquatic microcosms. *Environ Toxicol Chem* 36(5):1249–1253 <http://doi.org/10.1002/etc.3648>
- Ameres SL, Hung JH, Xu J, Weng Z et al (2011) Target RNA-directed tailing and trimming purifies the sorting of endo-siRNAs between the two *Drosophila* Argonaute proteins. *RNA* 17(1):54–63. <http://doi.org/10.1261/rna.2498411>
- Ameres SL, Zamore PD (2013) Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(8):475–488. <http://doi.org/10.1038/nrm3611>
- Andrade EC, Hunter WB (2016) RNA interference – natural gene-based technology for highly specific pest control (HiSPeC). In: Abdurakhmonov IY (ed) RNA interference. InTech. 391–409
- Andrade EC, Hunter WB (2017) RNAi feeding bioassay: development of a non-transgenic approach to control Asian citrus psyllid and other hemipterans. *Entomol Exp Appl* 162:389–396. <https://doi.org/10.1111/eea.12544>
- Araujo RN, Santos A, Pinto FS, Gontijo NF (2006) RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect Biochem Mol Biol* 36(9):683–693. <http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.05.012>
- Battistini C, Tamagnone L (2016) Transmembrane semaphorins, forward and reverse signaling: have a look both ways. *Cell Mol Life Sci* 73(8): 1609–1622. <http://doi.org/10.1007/s00018-016-2137-x>
- Baulcombe DC (2015) VIGS, HIGS and FIGS: small RNA silencing in the interactions of viruses or filamentous organisms with their plant hosts. *Curr Opin Plant Biol* 26:141–146. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.06.007>
- Bolognesi R, Ramaseshadri P, Anderson J, Bachman P (2012) Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *PLOS ONE* 7:e47534. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0047534>
- Bonning BC (2020) The Insect Virome: Opportunities and Challenges. *Curr Issues Mol Biol* 34:1–12. <http://doi.org/10.21775/cimb.034.001>
- Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P et al (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320(5880):1185–1190. <http://doi.org/10.1126/science.1159151>
- Cagliari D, Dias NP, Galdeano DM, Dos Santos EÁ (2019) Management of Pest Insects and Plant Diseases by Non-Transformative RNAi. *Front Plant Sci* 10:1319. <http://doi.org/10.3389/fpls.2019.01319>
- Carthew RW, Sontheimer EJ (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136(4):642–655. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>
- Christiaens O, Whyard S, Vélez AM, Smaghe G (2020) Double-Stranded RNA Technology to Control Insect Pests: Current Status and Challenges. *Front Plant Sci* 11:451. <http://doi.org/10.3389/fpls.2020.00451>
- Cikaluk DE, Tahbaz N, Hendricks LC, DiMattia GE et al (1999) GERp95, a membrane-associated protein that belongs to a family of proteins involved in stem cell differentiation. *Mol Biol Cell* 10(10):3357–3372. <http://doi.org/10.1091/mbc.10.10.3357>
- Cooper AM, Silver K, Zhang J, Park Y et al (2019) Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. *Pest Manag Sci* 75(1):18–28. <http://doi.org/10.1002/ps.5126>
- Dalakouras A, Jarausch W, Buchholz G, Bassler A et al (2018) Delivery of Hairpin RNAs and Small RNAs Into Woody and Herbaceous Plants by Trunk Injection and Petiole Absorption. *Front Plant Sci* 9:1253. <http://doi.org/10.3389/fpls.2018.01253>
- Dubelman S, Fischer J, Zapata F, Huizinga K et al (2014) Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils. *PLoS One* 9(3):e93155. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0093155>
- Fire A, Albertson D, Harrison SW, Moerman DG (1991) Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development* 113:503–514
- Fire A., Xu S., Montgomery MK, Kostas SA et al (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669): 806–811. <http://doi.org/10.1038/35888>
- Ganbaatar O, Cao B, Zhang Y, Bao et al (2017) Knockdown of *Mythimna separata* chitinase genes via bacterial expression and oral delivery of RNAi effectors. *BMC Biotechnol* 17(1):9. <http://doi.org/10.1186/s12896-017-0328-7>
- Gene-Silencing Pesticides Risks and Concerns. Eva Sirinathsinghi, Kendra Klein, Dana Perls. <https://foe.org/resources/gene-silencing-pesticides-risks-and-concerns/> (02.02.2022)
- Goulin EH, Galdeano DM, Granato LM, Matsumura EE et al (2019) RNA interference and CRISPR: Promising approaches to better understand and control citrus pathogens. *Microbiol Res* 226:1–9. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2019.03.006>
- GreenLight Biosciences Going Public to Fund RNA Product Pipeline. <https://www.ncbiotech.org/news/greenlight-biosciences-going-public-fund-rna-product-pipeline> (02.02.2022)
- Gutbrod MJ, Martienssen RA (2020) Conserved chromosomal functions of RNA interference. *Nat Rev Genet* 21(5):311–331. <http://doi.org/10.1038/s41576-019-0203-6>

- Hajeri S, Killiny N, El-Mohtar C, Dawson WO et al (2014) Citrus tristeza virus-based RNAi in citrus plants induces gene silencing in *Diaphorina citri*, a phloem-sap sucking insect vector of citrus greening disease (Huanglongbing). *J Biotechnol* 176:42–49. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.02.010>
- He B, Chu Y, Yin M, Müllen K et al (2013) Fluorescent nanoparticle delivered dsRNA toward genetic control of insect pests. *Adv Mater* 25(33):4580–4584. <http://doi.org/10.1002/adma.201301201>
- Head GP, Carroll MW, Evans S., Rule DM et al (2017). Evaluation of SmartStax and SmartStaxPRO maize against western corn rootworm and northern corn rootworm: efficacy and resistance management. *Pest Manag Sci* 73:1883–1899. <http://doi.org/10.1002/ps.4554>
- Hoffmann DB, Böker KO, Schneider S, Eckermann-Felkl E et al (2016) In Vivo siRNA Delivery Using JC Virus-like Particles Decreases the Expression of RANKL in Rats. *Mol Ther Nucleic Acids* 5(3):e298. <http://doi.org/10.1038/mtna.2016.15>
- Horwich MD, Li C, Matranga C, Vagin V et al (2007) The *Drosophila* RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC. *Curr Biol* 17(14):1265–1272. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.030>
- Hunter WB, Glick E, Paldi N, Bextine BR (2012) Advances in RNA Interference: DsRNA Treatment in Trees and Grapevines for Insect Pest Suppression. *Soutwest Entomol* 37(1):85–87. <http://doi.org/10.3958/059.037.0110>
- Huntzinger E, Izaurralde E (2011) Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 12(2):99–110. <http://doi.org/10.1038/nrg2936>
- Iwasaki S, Kobayashi M, Yoda M, Sakaguchi Y et al (2010) Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol Cell* 39(2):292–299. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.015>
- Iwasaki S, Sasaki HM, Sakaguchi Y, Suzuki T et al (2015) Defining fundamental steps in the assembly of the *Drosophila* RNAi enzyme complex. *Nature* 521(7553):533–536. <http://doi.org/10.1038/nature14254>
- Joga MR, Zotti MJ, Smagghe G, Christiaens O (2016) RNAi Efficiency, Systemic Properties, and Novel Delivery Methods for Pest Insect Control: What We Know So Far. *Front Physiol* 7:553. <http://doi.org/10.3389/fphys.2016.00553>
- Khan AM, Ashfaq M, Khan AA, Naseem MT et al (2018) Evaluation of potential RNA-interference-target genes to control cotton mealybug, *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Insect Sci* 018;25(5):778–786. <http://doi.org/10.1111/1744-7917.12455>
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115(2):209–216. [http://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00801-8](http://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00801-8)
- Kobayashi H, Tomari Y (2016) RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochim Biophys Acta* 1859(1):71–81. <http://doi.org/10.1016/j.bbasm.2015.08.007>
- Koch A, Biedenkopf D, Furch A, Weber L et al (2016) An RNAi-Based Control of *Fusarium graminearum* Infections Through Spraying of Long dsRNAs Involves a Plant Passage and Is Controlled by the Fungal Silencing Machinery. *PLoS Pathog* 12(10):e1005901. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005901>
- Kolliopoulou A, Taning CNT, Smagghe G, Swevers L (2017) Viral Delivery of dsRNA for Control of Insect Agricultural Pests and Vectors of Human Disease: Prospects and Challenges. *Front Physiol* 8:399. <http://doi.org/10.3389/fphys.2017.00399>
- Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K et al (2004) Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 117(1):69–81. [http://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00261-2](http://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00261-2)
- Li X, Zhang M, Zhang H (2011) RNA interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs. *PLoS One* 6(3):e17788. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0017788>
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG et al (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305(5689):1437–1441. <http://doi.org/10.1126/science.1102513>
- Liu Q, Rand TA, Kalidas S, Du F et al (2003) R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science* 301(5641):1921–1925. <http://doi.org/10.1126/science.1088710>
- Liu S, Jaouannet M, Dempsey DA, Imani J et al (2020) RNA-based technologies for insect control in plant production. *Biotechnol Adv* 39:107463. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107463>
- Liu X, Jiang F, Kalidas S, Smith D et al (2006) Dicer-2 and R2D2 coordinately bind siRNA to promote assembly of the siRISC complexes. *RNA* 12(8):1514–1520. <http://doi.org/10.1261/rna.101606>
- Lu M, Zhang Q, Deng M, Miao J et al (2008) An analysis of human microRNA and disease associations. *PLoS ONE* 3(10):e3420. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0003420>
- Luo J, Liang S, Li J, Xu Z et al (2017) A transgenic strategy for controlling plant bugs (*Adelphocoris suturalis*) through expression of double-stranded RNA homologous to fatty acyl-coenzyme A reductase in cotton. *New Phytol* 215(3):1173–1185. <http://doi.org/10.1111/nph.14636>
- Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP et al (2005) Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123(4):607–620. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.044>
- Matzke MA, Birchler JA (2005) RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet* 6(1):24–35. <http://doi.org/10.1038/nrg1500>
- Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y et al (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15(2):185–197. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.07.007>
- Mishra S, Dee J, Moar W, Dufner-Beattie J et al (2021) Selection for high levels of resistance to double-stranded RNA (dsRNA) in Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) using non-transgenic foliar delivery. *Sci Rep* 11(1):6523 <http://doi.org/10.1038/s41598-021-85876-1>
- Mitter N, Worrall EA, Robinson KE, Li P et al (2017) Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nat Plants* 3:16207. <http://doi.org/10.1038/nplants.2016.207>
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in

- reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant cell* 2:279–289. <http://doi.org/10.1105/tpc.2.4.279>
- Nouri S, Matsumura EE, Kuo YW, Falk BW (2018) Insect-specific viruses: from discovery to potential translational applications. *Curr Opin Virol* 33:33–41. <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.07.006>
- Nowara, D, Gay A, Lacomme C, Shaw J et al (2010) HIGS: Host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *Plant Cell* 22(9):3130–41. <http://doi.org/10.1105/tpc.110.077040>
- Orban TI, Izaurralde E (2005) Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA* 11(4):459–469. <http://doi.org/10.1261/rna.7231505>
- Pham JW, Pellino JL, Lee YS, Carthew RW et al (2004) A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell* 117(1):83–94. [http://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00258-2](http://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00258-2)
- Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T et al (2005) Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 309(5740):1573–1576. <http://doi.org/10.1126/science.1115079>
- Provost P, Dishart D, Doucet J, Frendewey D et al (2002) Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *EMBO J* 21(21):5864–5874. <http://doi.org/10.1093/emboj/cdf578>
- Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X (2005) Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123(4):621–629. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.020>
- RNAi pesticides target an existing pathway in insect pests. [https://www.rnaissanceag.net/solutions/\(24.03.2022\)](https://www.rnaissanceag.net/solutions/(24.03.2022))
- Rodrigues TB, Mishra SK, Sridharan K, Barnes ER et al (2021) First Sprayable Double-Stranded RNA-Based Biopesticide Product Targets Proteasome Subunit Beta Type-5 in Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). *Front Plant Sci* 12:728652. <http://doi.org/10.3389/fpls.2021.728652>
- Romano N, Macino G (1992) Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol* 6:3343–3353. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb02202.x>
- Saito K, Ishizuka A, Siomi H, Siomi MC (2005) Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in *Drosophila* cells. *PLoS Biol* 3(7):e235. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030235>
- San Miguel K, Scott JG (2016) The next generation of insecticides: dsRNA is stable as a foliar-applied insecticide. *Pest Manag Sci* 72(4):801–809. <http://doi.org/10.1002/ps.4056>
- Schirle NT, MacRae IJ (2012) The crystal structure of human Argonaute2. *Science* 336(6084):1037–1040. <http://doi.org/10.1126/science.1221551>
- Shabalina SA, Koonin EV (2008) Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends Ecol Evol* 23(10):578–587. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2008.06.005>
- SmartStax® PRO Technology to Launch. <https://www.bayer.com/en/us/smartstaxr-pro-technology-launch> (02.02.2022)
- Song MS, Rossi JJ (2017) Molecular mechanisms of Dicer: endonuclease and enzymatic activity. *Biochem J* 474(10):1603–1618. <http://doi.org/10.1042/BCJ20160759>
- Sasaya T, Nakazono-Nagaoka E, Saika H, Aoki H et al (2013) Transgenic strategies to confer resistance against viruses in rice plants. *Front. Microbiol* 4:1–11. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00409>
- Thakur N, Upadhyay SK, Verma PC, Chandrashekar K et al (2014) Enhanced whitefly resistance in transgenic tobacco plants expressing double stranded RNA of v-ATPase A gene. *PLoS One* 9(3):e87235. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0087235>
- Taning CN, Arpaia S, Christiaens O, Dietz-Pfeilstetter A et al (2020) RNA-based biocontrol compounds: current status and perspectives to reach the market. *Pest Manag Sci* 76(3):841–845. <http://doi.org/10.1002/ps.5686>
- Taning CNT, Christiaens O, Li X, Swevers L et al (2018) Engineered Flock House Virus for Targeted Gene Suppression Through RNAi in Fruit Flies (*Drosophila melanogaster*) in Vitro and in Vivo. *Front Physiol* 9:805. <http://doi.org/10.3389/fphys.2018.00805>
- TechAccel and Donald Danforth Center Launch RNAissance to Create Environmentally-Friendly Pesticides. <https://agfundernews.com/techaccel-and-donald-danforth-center-found-rnaissance-to-create-environmentally-friendly-pesticides> (02.02.2022)
- Tomari Y, Du T, Zamore PD (2007) Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. *Cell* 130(2):299–308. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.057>
- Tomari Y, Zamore PD (2005) Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 19(5):517–529. <http://doi.org/10.1101/gad.1284105>
- Turner CT, Davy MW, MacDiarmid RM, Plummer KM et al (2006) RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Molecul Biol* 15:383–91. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00656.x>
- Ufaz S, Balter A, Tzror C, Einbender S et al (2018) Anti-viral RNAi nanoparticles protect shrimp against white spot disease. *Mol Syst Des Eng* 3:38–48. <http://doi.org/10.1039/C7ME00092H>
- Whitten MM, Facey PD, Del Sol R, Fernandez-Martinez L et al (2016) Symbiont-mediated RNA interference in insects. *Proc Biol Sci* 283(1825):20160042 <http://doi.org/10.1098/rspb.2016.0042>
- Worrall E, Bravo-Cazar A, Nilon AT, Fletcher SJ et al (2019) Exogenous Application of RNAi-Inducing Double-Stranded RNA Inhibits Aphid-Mediated Transmission of a Plant Virus. *Front Plant Sci* 10: 265. <http://doi.org/10.3389/fpls.2019.00265>
- Yoon JS, Gurusamy D, Palli SR (2017) Accumulation of dsRNA in endosomes contributes to inefficient RNA interference in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochem Mol Biol* 90:53–60. <http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.09.011>
- Yoon JS, Mogilicherla K, Gurusamy D, Chen X et al (2018) Double-stranded RNA binding protein, Staufen, is required for the initiation of RNAi in coleopteran insects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(33):8334–8339 <http://doi.org/10.1073/pnas.1809381115>
- Zhang J, Khan SA, Hasse C, Ruf S et al (2015) Pest control. Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. *Science* 347(6225):991–994. <http://doi.org/10.1126/science.1261680>
- Zhang Y, Cui J, Zhou Y, Cao J et al (2018) Liposome mediated double-stranded RNA delivery to silence ribosomal protein

- P0 in the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. *Ticks Tick Borne Dis* 9(3):638–644. <http://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.01.015>
- Zhang X, Mysore K, Flannery E, Michel K et al. (2015). Chitosan/interfering RNA nanoparticle mediated gene silencing in disease vector mosquito larvae. *J Vis Exp* 97:52523. <http://doi.org/10.3791/2523>
- Zhang X, Zhang J, Zhu, KY (2010) Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect Mol Biol*. 19:683–693. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01029.x>
- Zheng Y, Hu Y, Yan S, Zhou H et al (2019) A polymer/detergent formulation improves dsRNA penetration through the body wall and RNAi-induced mortality in the soybean aphid *Aphis glycines*. *Pest Manag Sci* 75(7):1993–1999. <http://doi.org/10.1002/ps.5313>
- Zhu F, Xu J, Palli R, Ferguson J et al (2011) Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest Manag Sci* 67(2):175–82. <http://doi.org/10.1002/ps.2048>
- Zhu KY, Palli SR (2020) Mechanisms, Applications, and Challenges of Insect RNA Interference. *Annu Rev Entomol* 65:14.1–14.19 <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-02522>
- Zotti M, Dos Santos EA, Cagliari D, Christiaens O et al (2018) RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. *Pest Manag Sci* 74(6):1239–1250. <https://doi.org/10.1002/ps.4813>

Translation of Russian References

- Kirpichnikova A, Chen T, Romanyuk D, Yemelyanov V et al (2016) Peculiar features of plant cell vacuolar H⁺-ATPase regulation. *Biological Communications* 3(2): 149–160 <https://doi.org/10.21638/11701/spbu03.2016.212>
- Makarova YA, Kramerov DA (2007) Non-coding RNAs. *Biochemistry* 72(11):1427–1448.
- Maksimov IV, Shein MY, Burkhanova GF (2021) RNA interference in plant defense mechanisms. *Plant Physiology* 68(4):356–370. <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2022-105-1-15219>

Plant Protection News, 2022, 105(1), p. 28–39

OECD+WoS: 4.01+AM (Agronomy)

<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2022-105-1-15219>

Mini-review

RNA INTERFERENCE METHOD IN PLANT PROTECTION AGAINST INSECT PESTS

V.S. Zhuravlev*, V.V. Dolgikh, S.A. Timofeev, F.B. Gannibal

All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

**corresponding author, e-mail: v.guravlev@hotmail.com*

RNA-interference, or suppression of gene expression by small RNAs, was originally described in *Caenorhabditis elegans* in 1998 and is currently widely considered for use in plant protection. The use of double-stranded RNA molecules as an inducer of the RNA interference pathway in insect pests potentially allows employing them as active ingredients in modern pesticides. Genetically modified crops expressing dsRNA have been developed as commercial products with a great potential in insect pest management. Alternatively, some nontransformative approaches, including foliar spray and chemigation, are also suitable for practical applications. This review explains the mechanism of artificially induced RNA interference and existing strategies for the delivery of small RNAs to target insects within the framework of plant protection.

Keywords: small RNAs, RNA pesticides, gene silencing, molecular plant protection

Submitted: 23.01.2022

Accepted: 31.03.2022