

ВИКОРИСТАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ РНК-ІНТЕРФЕРЕНЦІЇ ДЛЯ ПОЛІПШЕННЯ ГОСПОДАРСЬКО-КОРИСНИХ ОЗНАК ЗЛАКОВИХ КУЛЬТУР

О.В. ДУБРОВНА, С.І. МИХАЛЬСЬКА, А.Г. КОМІСАРЕНКО

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, вул. Васильківська 31/17, Київ, 03022, Україна

E-mail: dubrovny@ukr.net

РНК-інтерференція (РНКі) являє собою новий потенційний інструмент для селекції рослин шляхом впровадження невеликих некодуючих послідовностей РНК із можливістю глушіння експресії генів специфічним для послідовності способом. Здатність до зниження експресії певного гена забезпечує можливість набуття нової характеристики шляхом елімінації або накопичення певних ознак рослин, що приводить до біохімічних або фенотипових змін, яких не мають вихідні рослини. У даному огляді літератури описано досягнутий за останні десятиріччя прогрес у застосуванні РНКі для створення злакових культур з полішеними господарсько-цінними ознаками. Коротко представлені основні етапи механізму глушіння генів, опосередкованого короткими інтерферуючими РНК (кіРНК), особливості їхнього біогенезу, спосіб дії та розповсюдження. Узагальнено численні приклади розробки різних біотехнологічних підходів до поліпшення злаків з використанням трансформації генів та екзогенних дволанцюгових молекул РНК (длРНК). Висвітлено можливість застосування технології РНКі для зміни агрономічних ознак рослин, підвищення харчової цінності та якості зерна, зменшення кількості токсичних сполук та алергенів. Значна увага приділена практичним результатам різноманітного застосування РНКі для підвищення стійкості зернових культур до біотичних стресових чинників, зокрема таких як віруси, бактерії, гриби, комахи-шкідники, нематоди. Наводяться приклади використання РНКі, опосередкованої кіРНК, для покращення резистентності зернових до абіотичних стресів, зокрема посухи та засолення.

Ключові слова: злакові культури, РНК-інтерференція, трансгенні рослини, агрономічні ознаки, якість зерна, стійкість до абіотичних та біотичних стресів.

Вступ

РНК-інтерференція (РНКі) — біологічний механізм управління активністю генів за допо-

могою формування коротких дволанцюгових РНК (длРНК) та синтезу спеціальних рибонуклеаз, що індукують селективну деградацію цільових РНК (вірусних, інформаційних, транспозонних) та/або інгібування їхньої трансляції чи реплікації (Bharathi et al, 2023; Halder et al, 2023). РНКі включає регуляцію експресії генів кількома способами: ефективного пост-транскрипційного мовчання генів (PTGS), інгібування трансляції, дестабілізації РНК та/або мовчання транскрипційних генів (TGS) шляхом спрямованого метилювання (Liu et al, 2021). Ключовими молекулами в РНКі є малі інтерферуючі РНК (кіРНК та міРНК), які можуть вступати у взаємодію із комплементарними послідовностями в інших молекулах РНК, наприклад у матричних РНК і пригнічувати їхню активність.

Явище РНК-інтерференції виявлено у клітинах більшості еукаріотів (людини, тварин, рослин, грибів, комах, нематод тощо) та бере участь у багатьох біологічних процесах — регуляції росту, розвитку, розмноженні та захисних реакціях організмів (Kumar et al, 2020; Hernández-Soto, Chacyn-Cerdas, 2021; Bilir et al, 2022; Halder et al, 2023). Механізм РНК-інтерференції був підтверджений у 1998 р. американськими вченими Ендрю Файром і Крейгом Мелло з використанням в якості об'єкта дослідження нематоди *Caenorhabditis elegans* (Fire et al, 1998). За це відкриття у 2006 р. дослідники отримали Нобелівську премію з фізіології та медицини.

Індукція в рослинах РНКі за допомогою трансгенезу, яка включає специфічну для послідовності генну регуляцію за участі малих некодуючих РНК, стала одним із найпотужніших підходів у поліпшенні сільськогосподарських культур, їхнього розвитку та захисту від

різних патогенів і шкідників шляхом маніпулювання експресією цільових генів (Qi et al, 2019; Abdellatef et al, 2021; Akbar et al, 2022; Bilir et al, 2022; Bharathi et al, 2023).

Вважають, що трансгенні рослини, створені на основі РНКі, є вигідними і екологічно чистішими, оскільки вони не продукують жодних функціонально чужорідних білків та біоцидних речовин, а також не забруднюють довкілля (Rajam, 2020; Rodrigues and Petrick, 2020; Kaur et al, 2021). Крім того, РНКі генерує нокдаун цільового гена замість нокауту, що робить її більш вигідною порівняно з нещодавно розробленими інструментами редагування геному (Mezzetti et al, 2020). Технології РНКі можна використовувати для зниження експресії будь-яких генів, не порушуючи експресію інших генів. Ці унікальні особливості РНКі зробили її популярною та ефективною стратегією покращення та захисту сільськогосподарських рослин (Mezzetti et al, 2020; Rajam, 2020). В даний час основним напрямом стало створення генномодифікованих та генно-редагованих сортів і гібридів різних культур з підвищеними показниками врожайності та якості, в тому числі і з використанням поєднаної технології редагування генів CRISPR/CasN з компонентами технології РНКі (Singh et al, 2019).

Роль технології РНКі у поліпшенні сільськогосподарських рослин було показано при отриманні плодів без кісточок, регуляції біомаси рослин, покращенні якості зерна, зміни забарвлення квіток та їх запаху, збільшенні терміну зберігання фруктів і овочів, регуляції вторинного метаболізму (Kamthan et al, 2015). Ця технологія також була використана для підвищення толерантності рослин до різних біотичних (бактерії, гриби, віруси, нематоди, комахи) та абіотичних стресів (посуха, засолення, холод тощо) (Ali et al, 2010; Dutta et al, 2015; Ghag, 2017; Halder et al, 2023). Покращення поживних властивостей рослин було досягнуто шляхом їхнього збагачення незамінними амінокислотами, жирними кислотами, антиоксидантами та іншими поживними речовинами, корисними для здоров'я людини або шляхом зменшення кількості алергенів чи антинутриєнтів (Katoch and Thakur, 2013; Younis et al, 2014).

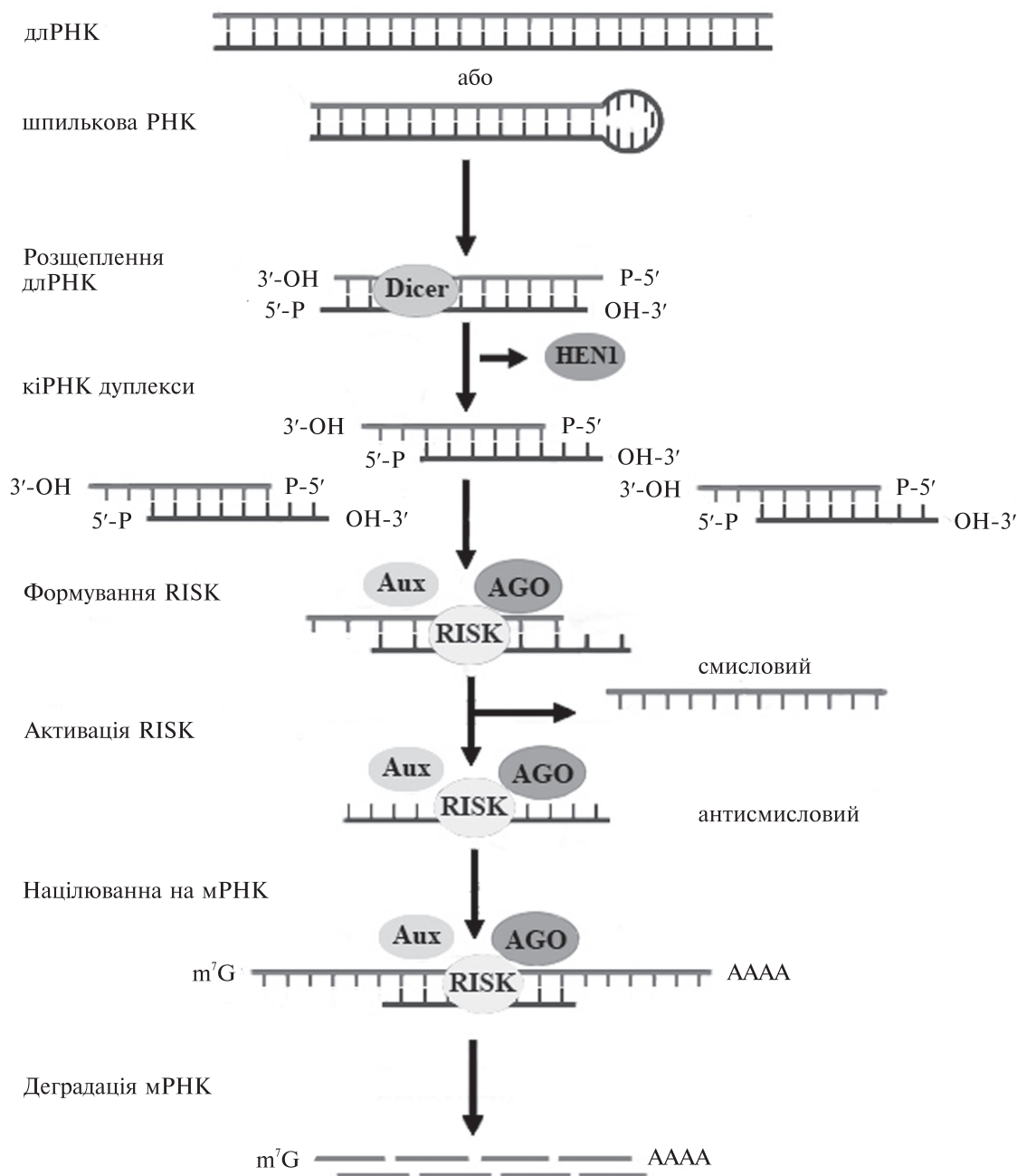
Злакові – це економічно найважливіша родина рослин, що забезпечує основні продукти

харчування з одомашнених зернових культур, таких як кукурудза, пшениця, рис, ячмінь та просо, а також корм для домашніх тварин. Відомо, що до 50 % білка і до 65 % калорій людство одержує від використання зерна злаків, також вони застосовуються як будівельні матеріали, є джерелом біопалива (Godwin et al, 2009). У даному огляді висвітлено досягнення практичного застосування РНКі, заснованої на технології генетичної модифікації та участі кіРНК, у покращенні різних властивостей злакових рослин.

Механізм РНК-інтерференції

Механізм РНКі полягає в індукції дволанцюговими РНК (длРНК) процесів розпізнавання і деградації клітинної мРНК. Найважливішим аспектом механізму РНКі є те, що він не змінює хромосомну первинну структуру цільових генів, але здатний значно послаблювати їхню експресію і приводити до певних змін фенотипу клітин та цілих організмів (Baulcombe, 2019). Система РНКі відрізняється консервативністю та надзвичайною розбірливістю: кожна розпізнає і замовчує тільки свою цільову РНК. У рослинах РНКі запускається длРНК, які можуть мати різні джерела походження, починаючи від проміжних продуктів реплікації вірусу, транскрипції інвертованих повторів, стрес-індукованого перекриття анти-смыслових транскриптів, і транскрипції РНК-залежною РНК-полімеразою аберантних транскриптів (Dalakouras et al, 2020).

У трансгенних рослин технологія РНКі заснована на глушінні мРНК цільових генів за допомогою генетичних конструкцій, що містять інвертовані повторювані послідовності фрагментів цих генів. мРНК, транскрибована з таких конструкцій, утворює шпилькову структуру (Younis et al, 2014). Початковий етап РНКі пов'язаний з доставкою длРНК (через введення трансгенів) в клітину, яка абсолютно гомологічна, за послідовністю, цільовому гену (Ali et al, 2010). На першому етапі в результаті індукції ферментативної активності DCL-подібних рибонуклеаз (Dicer-like dsRNAses), характерних для вищих рослин, відбувається деградація довгої длРНК/шпРНК (РНК шпилькової петлі з чужорідних генів). Гідролітичне розщеплення длРНК, що каталізується DCL,



Механізм глушіння генів у рослин, опосередкований кіРНК

зрештою приводить до утворення коротких дволанцюгових фрагментів (дуплексів), названих короткими інтерферуючими РНК, завдовжки 21–24 нуклеотидів (нт), з 5'-кінцевою фосфатною групою та симетричними виступами у 2 нуклеотида на 3'-кінці, які стабілізуються завдяки метилюванню 3'-кінців за допо-

могою метилтрансферази HUA Enhancer 1 (HEN1) (Kaur et al, 2021). Дволанцюгові дуплекси зв'язуються за участі допоміжних білків Aux з ефекторним білком Argonaute (AGO), щоб сформувати ядро РНК-індукованого комплексу глушіння (RNA-induced silencing complex, RISC). На наступному етапі РНКі відбу-

вається розділення обох ланцюгів утворених раніше дуплексів. При цьому смисловий ланцюг (пасажирський) деградує, а антисмисловий (напрямний, який характеризується меншою термодинамічною стабільністю 5'-кінця), включається в AGO для формування активованого RISC та використовується як «навігатор», завдяки якому білок AGO розщепить ту молекулу, яка буде комплементарна антисмислового ланцюгу (Rajam, 2020). Після завантаження RISC відстежує його споріднену мРНК і забезпечує понижувальну регуляцію бажаного гена(ів) або шляхом деградації цільової мРНК, або репресії трансляції (Kaur et al, 2021). Цільова мРНК, комплементарна напрямній послідовності кіРНК довжиною у 21 нт, у зрілому RISC розщеплюється між 10-м і 11-м нуклеотидом (з 5'-кінця) доменом PIWI білка AGO, утворюючи продукти, що містять 5'-монофосфатні і 3'-гідроксильні кінці (Halder et al, 2023). Ці продукти розщеплення швидко руйнуються під дією ендогенної екзонуклеази через відсутність 5'-кепіngu або 3'poly(A) хвоста. Після завершення розщеплення RISC відходить, і кіРНК може бути використана в новому циклі мРНК розпізнавання та розщеплення. Узагальнена схема механізму РНКі, опосередкованого кіРНК, представлена на рисунку.

Комплементарні ділянки мРНК-мішені одноланцюгові фрагменти кіРНК можуть бути використані як праймери для рослинної РНК-залежної РНК полімерази (RdRP), яка добуває другий ланцюг, використовуючи РНК-мішень як матрицю (ефект обмежений відстанню ~300–500 нуклеотидів в 5'-напрямі від сайту початку розщеплення). В ході здійснюваної DCL-рибонуклеазою деградації *de novo* синтезованих длРНК відбувається утворення нових кіРНК, які називають вторинними. Таким чином здійснюється ампліфікація сигналу. Вторинні кіРНК надалі можуть не лише брати участь у прямій деградації мРНК-мішені у складі RISC, але й транспортуватися між клітинами плазмодесмами як сигнальні молекули.

Короткі інтерферуючі РНК (кіРНК)

Відкриті у 1999 р. (Hamilton and Baulcombe, 1999) кіРНК є некодуючими молекулами, розміром 20–24 нт, які зустрічаються у різних організмів і беруть участь у багатьох регулятор-

них процесах. Вони є ключовими компонентами для клітинних функцій під час розвитку рослин, передачі сигналів гормонів і відповіді на стрес. Їх попередником є довга длРНК, вони, на відміну від мікроРНК, повністю комплементарні з послідовністю цільового гена. Механізм регуляції генів – транскрипційний та посттранскрипційний, а спосіб дії – модифікація гістонів, метилювання ДНК, деградація мРНК (Halder et al, 2023). кіРНК у рослин розрізняються за білками сімейства AGO (AGO1, AGO4, AGO6, AGO7), каталітичного компоненту комплексу глушіння, здебільшого на основі розміру, а також ідентичності на рівні 5'-нуклеотидів, щоб утворити RISC, який опосередковує посттранскрипційне мовчання генів через розщеплення мРНК або репресію трансляції (Halder et al, 2023). Вони відіграють головну роль у регулюванні механізму захисту рослин проти потенційних збудників, таких як бактерії, віруси, гриби, ооміцети, паразитичні нематоди та рослини-паразити.

кіRNA добре відомі своєю функцією глушіння у випадку вірусних РНК (Akbar et al, 2022). При цьому, 21–22 нт кіРНК беруть участь у безпосередній деградації вірусної РНК та деяких ендогенних мРНК, важливих у системі захисту проти вірусів. 21-нуклеотидні кіРНК з 5'-U завантажуються на AGO1 і сканують цитоплазму на наявність комплементарних транскриптів для розщеплення та деградації в процесі посттранскрипційного мовчання генів. 22-нуклеотидні кіRNA також завантажуються на AGO1, але, очевидно, змінюють конформацію AGO1 і залучають RdRP до 3' – послідовності, транскрибуючи цільовий транскрипт у длРНК і таким чином генеруючи додаткові (вторинні) кіРНК у механізмі, названому «транзитивним мовчанням» (Dalakouras et al, 2020). Останні дослідження надали докази здатності кіРНК пригнічувати розвиток грибів та ооміцетів, замовчуючи специфічні гени збудника, пов'язані з патогенезом (Canto-Pastor, 2019; Sang and Kim, 2020). Вчені дійшли висновку, що кіРНК є потенційною сумішшю різноманітних генних послідовностей і використовуються як «дробовик», який з великою ефективністю вражає певні гени патогена (Fletcher et al, 2020).

Некодуючі кіРНК дуже мобільні та здатні переміщуватись як усередині одного, так і між вза-

емодіючими організмами (наприклад, від рослини-господаря до патогену і навпаки). У рослин вони, як правило, пересуваються флоемою з областей з високою концентрацією в місця із дефіцитом цих молекул (Kong et al, 2022). Пересування кіРНК по рослині поділяють на міжклітинний (ближній) та системний (далекий) транспорт. Це відбувається від місця ініціації до сусідніх клітин через міжклітинні канали плазмодесми, а також поширюється системно на великі відстані через провідну тканину флоєми. Системний рух сигналу сайленсингу відбувається впродовж кількох днів після ініціації і, як правило, спрямований від фотосинтетичних джерел (тобто листя) до коренів і точок зростання.

Родина споріднених генів може бути заглушена лише однією конструкцією РНКі через

гетерогенність послідовностей кіРНК. Проте застосування стратегії РНКі на основі кіРНК може викликати й непередбачувані ефекти, що призводять до ненавмисного глушіння нецільових генів з ділянками, гомологічними послідовностям цільового гена. Крім того, оскільки посттранскрипційний сайленсинг генів у рослин є рухливим, може бути викликаний локально, а потім поширюватися по всій рослині, тому технології РНКі, опосередковані кіРНК, можуть бути непридатними для деяких застосувань, що вимагають тканинспецифічного глушіння генів.

Поліпшення господарсько-цінних ознак злакових рослин на основі РНКі, опосередкованої кіРНК

РНКі має великий потенціал для зміни експресії генів у злакових рослин для поліпшен-

Поліпшення господарсько-цінних ознак злакових рослин шляхом РНК-інтерференції, опосередкованої кіРНК

Ознака для поліпшення	Цільовий ген	Культура	Посилання
<i>Агрономічні ознаки</i>			
Висота рослин, урожайність	DWARF4 GA20ox2 GA20ox2; EAT1	рис	Feldmann, 2006 Qiao et al, 2007 Ansari et al, 2017
<i>Харчова цінність та якість зерна</i>			
Поліпшення хлібопекарської якості борошна і тіста	γ-гліадин α-гліадин ω-5- гліадин α-, γ-, ω-гліадини	пшениця	Gil-Humanes et al, 2008, 2012; Pistón et al, 2011 Wieser et al, 2006 Altenbach et al, 2014b Gil-Humanes et al, 2010
Зниження вмісту імуногенних епітопів	ω-5- гліадин α-, γ-, ω-гліадини	пшениця	Altenbach et al, 2014a Gil-Humanes et al, 2010; Barro et al, 2016
Підвищення вмісту незамінних та вільних амінокислот	DME Lgc1 α-зеїни	пшениця, ячмінь рис кукурудза	Wen et al, 2012 Kusaba et al, 2003 Segal et al, 2003; Huang et al, 2006
Краща перетравність білка, підвищений вміст лізину	γ-кафірин	сорго	DaSilva et al, 2011; Kumar et al, 2012; Grootboom et al, 2014; Elkonin et al, 2016
Підвищення вмісту вільного лізину	Проламін 10 та 13 кДа Lkr/sdh CordapA zkr/sdh	рис кукурудза	Kawakatsu et al, 2010; Kim et al, 2013 Long et al, 2012 Huang et al, 2005 Houmard et al, 2007; Frizzi et al, 2008

Продовження таблиці

Ознака для поліпшення	Цільовий ген	Культура	Посилання
Збільшення твердості зерна	Pina, Pinb Sina, Sinb	пшениця, тритикале	Gasparis et al, 2011; Gasparis et al, 2013
Підвищений вміст амілози	SbeIIa, SbeIIb	пшениця	Regina et al, 2006
Зниження вмісту фітинової кислоти	Rino1 IPK1 MIPS	рис	Kuwano et al, 2006 Ali et al, 2013a Ali et al, 2013b
Збільшення вмісту крохмалю в листі	Gwd	кукурудза	Weise et al, 2012
<i>Біотичні стреси</i> <i>Стійкість до вірусів</i>			
Barley yellow dwarf virus (BYDV)	BYDV-PAV	ячмінь	Wang et al, 2000
Rice gall dwarf virus (RGDV)	Pns 9 Trigger_G9	рис	Shimizu et al, 2012
Rice black streak dwarf virus (RBSDV)	S1, S2, S6, S10 S7-2, S8 S1, S2, S6 P9-1	рис	Wang et al, 2016 Ahmed et al, 2017 Feng et al, 2021 Sasaya et al, 2014
Rice dwarf virus (RDV)	Pns 4, Pns12 Pns 6, P8, Pns12	рис	Shimizu et al, 2009 Sasaya et al, 2014
Rice stripe virus (RSV)	pC3, pC4 CP, SP, CP/SP CP, SP	рис	Shimizu et al, 2011 Ma et al, 2011 Zhou et al, 2012
Rice grassy stunt virus (RGSV)	pC5, pC6	рис	Shimizu et al, 2013
Rice ragged stunt virus (RRSV)	S6gp1 S9gp1, S10gp1	рис	Lacombe et al, 2021
Rice tungro bacilliform virus (RTBV); Rice tungro spherical virus (RTSV)	RTBV ДНК RTSV κДНК CP1, CP2, CP3, NTP ORF IV	рис	Verma et al, 2012; Sharma et al, 2018 Le et al, 2015 Tyagi et al, 2008
Sugarcane mosaic virus (SCMV)	CP, Hc-Pro	цукрова тростина	Akbar et al, 2017
Sorghum mosaic virus (SrMV)	CP		Guo et al, 2015
Maize dwarf mosaic virus (MDMV)	CP, P1	кукурудза	Zhang et al, 2010, 2011, 2013
Maize streak virus (MSV)	Rep		Shepherd et al, 2007
Wheat streak mosaic virus (WSMV)	NIa CP	пшениця	Fahim et al, 2010 Sivamani et al, 2002; Li et al, 2005; Cruz et al, 2014
Triticum mosaic virus (TriMV)	NIb CP		Sivamani et al, 2000 Shoup Rupp et al, 2016
<i>Стійкість до грибів та бактерій</i>			
Fusarium graminearum	Chs3b SGE1, STE12, PP1 CYP51A, CYP51B, CYP51C Fg00677, Fg08731 CYP51A, CYP51B, CYP51C	пшениця ячмінь куцоніжка двоко- лоскова	Cheng et al, 2015 Wang et al, 2020 Koch et al, 2013 He et al, 2019
Fusarium culmorum	Gls1, Fmk1, Fgl1, ChsV	пшениця	Chen et al, 2016
Fusarium verticillioides	FUM1, FUM8	кукурудза	Johnson et al, 2018
Puccinia triticina Erikss	MAPK1, CYC1, CNB	пшениця	Panwar et al, 2013a, 2018
Puccinia striiformis f. sp. tritici	GSRE1 CPK1 Fuz7 CSN5	пшениця	Qi et al, 2019 Qi et al, 2018 Zhu et al, 2017 Bai et al, 2021

Ознака для поліпшення	Цільовий ген	Культура	Посилання
Blumeria graminis f.sp.hordei; f.sp. tritici Blumeria graminis f. sp. tritici	Avra10	ячмінь, пшениця	Nowara et al, 2010
	GTF1, GTF2		
	MLO	пшениця	Riechen, 2007; Va'rallyay et al, 2012 Schaefer et al, 2020
Magnaporthe grisea Xanthomonas oryzae Magnaporthe oryzae Rhizoctonia solani	SvrPm3a1/fl1, Bgt_Bcg-6, Bgt_Bcg-7		
	FAD7, FAD8	рис	Yara et al, 2007 Jiang et al, 2009
	SSI2	рис	Zhu et al, 2017
Xanthomonas oryzae pv. oryzae	ABC1, MAC1, PMK1	овсяниця висока	Zhou et al, 2016
	RNAPoly, Imbs, Coh, UbiE3		
	RPMK1-1, RPMK1-2	рис	Tiwari et al, 2017
Aspergillus flavus	aflC aflR aflM	кукурудза	Thakare et al, 2017 Masanga et al, 2015 Raruang et al, 2020
Xanthomonas oryzae pv. oryzae	8N3	рис	Yang et al, 2006
<i>Стійкість до комах</i>			
Diabrotica virgifera virgifera LeConte	V-ATPase A Snf7	кукурудза	Baum et al, 2007 Bolognesi et al, 2012 Hu et al, 2016
Sitobion avenae F.	ssj1, ssj2		
	shp	ячмінь	Abdellatef et al, 2015
	ZFP	пшениця	Sun et al, 2019 Xu et al, 2017 Zhao et al, 2018 Xu et al, 2014
Nilaparvata lugens Stal	lmf2-like		
	CHS1		
	CbE E4	рис	Zha et al, 2011 Yu et al, 2014
Apolygus lucorum Meyer-Dür	NIHT1, Nlcar, Nltry EcR-c	рис	
Meloidogyne graminicola Heterodera avenae	AlucV-ATPase-E	кукурудза	Liu et al, 2019
	<i>Стійкість до паразитичних нематод рослин</i>		
	flp1, flp12	рис	Hada et al, 2020
Heterodera avenae	галексин, катепсин L, var1, серпин, flp12, RanBPM хітиназа	пшениця	Dutta et al, 2020
	Nhr, Pbp, Ibp, Eps		Gantasala et al, 2015
	Ha-annexin		Chen et al, 2015
<i>Стійкість до рослин-паразитів</i>			
Striga asiatica	гени жирних кислот, ароматичних амінокислот, биосинтезу АМФ, морфо- генезу вакуоль	кукурудза	de Framond et al, 2007
<i>Стійкість до абіотичних стресів</i>			
Посуха	RACK1	рис	Li et al, 2009
	GRXS17		Hu et al, 2017
	ProDH	пшениця	Dubrovna et al, 2020; 2022
Засолення	RPK1	кукурудза	Mykhalska et al, 2014
		рис	Li et al, 2020

ня їхніх якісних характеристик та поживного статусу, підвищення стійкості до абіотичних і біотичних стресів. Такий підхід полегшує ідентифікація гена-мішені та розробка векторних конструкцій РНКі для трансформації. Для стабільного глушіння генів використовуються шпилькові конструкції РНКі, що містять часткову послідовність цільового гена (200–300 п.н.) у смислової і антисмислової орієнтації з невеликим інтроном між ними під контролем відповідного промотора, призначеного для експресії дРНК у трансгенних рослинах (Rajam, 2020). Узагальнені практичні результати застосування РНК-інтерференції, опосередкованої кіРНК, для покращення злакових культур представлені у таблиці.

Агрономічні ознаки

РНКі можна успішно використовувати для підвищення врожайності злакових культур шляхом маніпулювання основними агрономічними ознаками рослин такими як їхня висота та розмір, розгалуженість куща, маса зерна. РНКі-опосередкований нокдаун гена рису *DWARF4*, який бере участь у синтезі брасиностероїдів, привів до зниження висоти рослин та утворення еректоїдних (прямосячих) листків, що сприяє збільшенню фотосинтезу в нижніх листках та зберіганню азоту для наливу зерна. Такі рослини мають потенціал для підвищення врожайності в умовах щільного посіву (Feldmann, 2006). РНКі-опосередковане пригнічення гена *GA20ox2* рису, який кодує регуляторний фермент синтезу біологічно активних гіберелінів, привело до утворення напівкарликових рослин у високорослого сорту QX1. Трансгенні рослини показали значне збільшення довжини волоті і кількості насінин на ній та більшу масу 1000 зерен (Qiao et al, 2007). У цієї культури технологію РНКі було застосовано для синергічного регулювання висоти рослин і чоловічої фертильності з метою створення напівкарликових чоловічостерильних рослин (Ansari et al, 2017). Трансгенні рослини рису покоління T0-T2, з одночасно пригніченою експресією генів *GA20ox2* і *EAT1* (задіяний у функціонуванні тапетуму та мікроспор) показали значно зменшену висоту рослин і повний фенотип чоловічої стерильності.

Поліпшення якості зерна

В останні роки технологія РНКі інтенсивно застосовується для підвищення поживної цінності низки злакових культур, а також для отримання нової інформації про механізми формування структури ендосперму та ролі різних класів проламінів у визначенні технологічних властивостей борошна та тіста (El'konin et al, 2016). Відомо, що у зерні злаків запасні білки становлять до 80 % загального вмісту білка зрілого насіння (Godwin et al, 2009).

Основною білковою частиною зерна пшениці є глютен, який значною мірою відповідає за функціональні властивості тіста. Гліadini головним чином сприяють розтяжності та в'язкості клейковини та тіста, а полімерні глютеніни відповідають за його еластичність. У пшениці сорту Bobwhite було отримано сім трансгенних ліній із сайленсингом гена γ -гліадину (Gil-Humanes et al, 2008) у яких їхня частка була знижена на 33–80 %, що сприяло утворенню більш міцного тіста з покращеною стійкістю до надмірного перемішування. Згодом ті ж дослідники використали інтерферуючі РНК, здатні пригнічувати гени всіх трьох груп α -, γ - та ω -гліадинів, та отримали лінії пшениці зі значним зменшенням (у деяких випадках до 90 %) вмісту гліадину (Gil-Humanes et al, 2010). Надалі конструкцію для РНК-сайленсингу за допомогою схрещувань перенесли до трьох інших сортів м'якої пшениці, що привело до збільшення кількості високо- і низькомолекулярних глютенінів і показника SDS-седиментації (Gil-Humanes et al, 2012). Показано, що приглушення γ -гліадинів за допомогою РНКі у лініях пшениці приводить до збільшення вмісту всіх інших білків глютену, проте незначно впливає на параметри тесту SDS (Pistón et al, 2011). Також повідомлялося про отримання трансгенної пшениці із сайленсингом гена α -гліадину, яка характеризувалася підвищеним показником сили борошна та збільшенням об'єму випічки (Wieser et al, 2006).

Пшенично-залежна анафілаксія, спричинена фізичним навантаженням (WDEIA) – рідкісна, але потенційно важка харчова алергія, що характеризується анафілактичними реакціями, які виникають через 1–4 год після вживання пшениці з подальшим фізичним навантаженням. Саме наявність ω -5-гліадину пов'я-

зана з цією харчовою алергією. З використанням технології РНКі отримані трансгенні лінії пшениці зі зниженим рівнем омега-5-гліадину (Altenbach et al, 2014a). Встановлено, що ω -5-гліадини негативно впливають на якість борошна, тому трансгенні лінії з пригніченим їхнім синтезом відрізняються кращою його якістю (Altenbach et al, 2014b).

Слід зазначити, що у ліній трансгенної пшениці з пригніченим синтезом гліадинів борошно менш токсичне для людей, які хворіють на целиацію і змушені дотримуватися безглютенової дієти. Було показано, що білки клейковини у трансгенних ліній пшениці з сайленсингом генів α -, γ - та ω -гліадинів знижують утворення пов'язаних з проявом целиації специфічних епітопів DQ2 та DQ8, які розпізнаються Т-лейкоцитами (Gil-Humanes et al, 2010). Отже, така пшениця може бути використана для харчування людей при целиації, які не можуть споживати продукти зі звичайного борошна пшениці, жита, ячменю. Описана спроба розробити природну дієтичну терапію для цього розладу шляхом пригнічення транскрипції гомеологів DEMETER (*DME*) пшениці за допомогою РНКі. *DME* кодує 5-метилцитозин ДНК-глікозилазу, відповідальну за дерепресію транскрипції гліадинів і низькомолекулярних глютенінів шляхом активного деметилювання їхніх промоторів в ендоспермі пшениці. Попередні дослідження виявили, що ці білки є основним джерелом імуногенних епітопів. Отримано трансформанти пшениці, які експресують шпилькову РНК у своєму ендоспермі та показали до 85,6 % пригнічення кількості транскриптів *DME* і до 76,4 % зменшення кількості імуногенних проламінів, демонструючи можливість створення сортів пшениці, сумісних для пацієнтів з целиацією (Wen et al, 2012). Розроблені плазмиди, що охоплюють фрагменти РНК від α -, γ -, ω -гліадинів та субодиниць низькомолекулярного глютеніну для глушіння експресії різних фракцій проламінів (Varro et al, 2016). У трансгенних рослин пшениці, які несли певні їхні комбінації у цих плазмідах, відбувалося сильне зниження вмісту глютену (вище 90 %) порівняно з контрольними. Частина модифікованих ліній була повністю позбавлена епітопів целиації з високо імуногенних α - та ω -гліадинів. Ці результати підви-

щують перспективу створення нетоксичних сортів пшениці з низьким рівнем шкідливого глютену. Цікаво, що у рису виявлено природну мутацію *Lgc1* (low glutelin content), що знижує вміст глютеліну в зернівках, ймовірно, на основі РНКі. У локусі *Lgc1* виявлено делецію між двома послідовностями гена глютеліну, одна з яких має інвертовану орієнтацію. Така структурна організація локусу в процесі його транскрипції може приводити до утворення длРНК – індуктора РНКі. Гіпотеза про те, що *Lgc1* пригнічує експресію глютеліну через РНКі, підтверджується аналізом створених трансгенних рослин, які характеризуються опосередкованим шпРНК глушінням гена *Lgc1* (Kusaba et al, 2003). У модифікованих рослин лінії LGC1, вміст глютеліну знижується, що може мати значення для людей із хворими нирками, які потребують обмеження споживання білка.

Основні запасні білки зерна кукурудзи, зеїни, мають дефіцит вмісту лізину та триптофану, що сприяє низькій поживній якості кукурудзи. У даній культурі з використанням генетичних конструкцій, що містять інвертовані повтори генів α -зеїнів (19 і 22 кДа) отримані трансгенні лінії з пригніченим синтезом цих білків (Segal et al, 2003; Huang et al, 2006). Виявилось, що репресія синтезу зеїнів, що мають порівняно низьку поживну цінність, веде до накопичення інших білків із більш високою поживною цінністю. Рослини кукурудзи із сайленсингом цих генів характеризувалися подвоєним вмістом незамінних амінокислот триптофану та лізину в зернівках. Крім того, у трансгенних рослин спостерігалось значне збільшення накопичення вільних амінокислот, що складаються переважно з аспарагіну, аспартату та глутамату (Huang et al, 2006).

Великий обсяг експериментів було виконано з індукції РНК-сайленсингу генів кафіринів у сорго, основна мета яких полягала у пригніченні важкоперетравного γ -кафірину та створенні ліній, покращених за поживною цінністю. Отримано трансгенні лінії з пригніченим синтезом γ -кафірину та поліпшеною якістю білка, рослини яких характеризувалися кращим розщепленням кафірину пепсином (Da-Silva et al, 2011; Kumar et al, 2012; Grootboom et al, 2014). Створено трансгенне сорго з покращеною перетравністю запасних білків зер-

на та зміненим складом амінокислот (підвищення відносного вмісту лізину у 1,6–1,7 рази) (Elkonin et al, 2016). Вища перетравність спостерігалася у рослин різних поколінь (Т1–Т3), тобто успадковувалася. Аналіз показав, що кількість неперетравленого білка в трансгенних рослинах Т3 зменшилась у 2,9–3,2 рази порівняно з вихідною нетрансгенною лінією, а індекс перетравності сягнув 85–88 %. Примітно, що поряд із рослинами з борошністим типом ендосперму були отримані форми, що поєднували високу перетравність кафіринів з наявністю в ендоспермі склоподібного шару. Слід зазначити, що у зерні, яке має склоподібний ендосперм, переважає прикріплений білок, який міцно пов'язаний з крохмальними гранулами, обволікаючи їх і з'єднуючи у монолітну склоподібну масу. У борошністому ендоспермі переважає проміжний білок, який слабо пов'язаний із зернами крохмалю у вигляді окремих перемичок з наявністю повітряних включень, що зумовлює його знижену міцність. Відсутність склоподібності підвищує крихкість зернівок та знижує їх стійкість до ураження грибною мікрофлорою (Elkonin et al, 2016). Тому рослини із склоподібним ендоспермом становлять значний інтерес для селекції, оскільки він необхідний для захисту зернівки від патогенів та механічних пошкоджень.

Підходи, засновані на РНКі, дуже перспективні для вирішення проблеми збагачення зерна злаків незамінними амінокислотами – лізином, триптофаном, метіоніном. Проте в даний час успішних результатів щодо зміни амінокислотного складу зерна досягнуто тільки для лізину шляхом пригнічення генів, що регулюють його катаболізм або пригнічення синтезу білків з низьким його вмістом, внаслідок чого ініціюється синтез білків, багатих на лізин. У трансгенних рослин рису використання РНКі для сайленсингу генів 13 кД проламінів виявило збільшення вмісту вільного лізину на 28–56 % внаслідок компенсаторного збільшення синтезу багатих лізином глютелінів, глобулінів та шаперонів, що підвищує поживну цінність зерна (Kawakatsu et al, 2010; Kim et al, 2013). Повідомлялося про отримання трансгенних рослин рису з генами, що підсилюють синтез лізину, які кодують аспартаткіназу (АК) та дигідропіколінатсинтазу (DHPS), і констру-

кціями, що індують РНКі редуктази лізин-кетоглутарової кислоти рису/сахаропін-дегідропін-дегідрогенази (LKR/SDH) для зниження її катаболізму. Шляхом комбінованої експресії АК і DHPS та РНКі LKR/SDH у цих рослин зареєстрували 60-кратне збільшення вмісту вільного лізину в зерні (Long et al, 2012).

Дигідродіпіколінатсинтаза (DHDPS) каталізує перший етап біосинтезу лізину. Її особливість полягає у чутливості до пригнічення кінцевим продуктом, що дозволяє підтримувати концентрацію лізину в клітинах рослин на постійному рівні. Із бактерії *Corynebacterium glutamicum* виділено змінений фермент DHDPS, названий CordapA, нечутливий до інгібування лізином. Отримано лінію трансгенної кукурудзи M27908 з геном *CordapA*, у якої вміст вільного лізину зріс більш ніж у 50 разів (Huang et al, 2005). При схрещуванні ліній кукурудзи з РНКі гена α -зеїну (19 кДа) з лінією M27908 були отримані гібриди F1 у яких вміст лізину в зернівках зріс до 6,9–8,5 % від загального вмісту амінокислот (у контролі – 3,3–3,4 %) (Huang et al, 2006). Таким чином, завдяки поєднанню двох підходів (пригнічення синтезу білків з низьким вмістом лізину та введення гена, що посилює синтез цієї амінокислоти) вдалося створити гібридну кукурудзу з подвоєним вмістом лізину в зернівках. З використанням генетичної конструкції, що індукує РНКі гена *zlkr/sdh*, у кукурудзи були отримані трансгенні рослини, у яких вміст лізину зріс у 20 разів порівняно з нетрансгенним контролем (Houmard et al, 2007). Надалі з використанням єдиної касети, у складі якої був ген *CordapA*, що посилює біосинтез лізину, і генетична конструкція, що індукує РНКі гена *zlkr/sdh* і тим самим знижує його катаболізм, були отримані трансгенні рослини з 40-кратним збільшенням кількості цієї амінокислоти в зернівках (Frizzi et al, 2008).

Важливою агротехнічною ознакою є твердість зерна злаків, яка впливає на якість борошна і властивості кінцевих продуктів. Фенотип м'якого зерна у пшениці визначається алелями генів *Pina* та *Pinb* і будь-які мутації в одному або обох генах *Pin* приводять до більш менш твердіших зерен. Повідомлялося про підвищення твердості зерна після опосередкованого кіРНК глушіння генів *Pina* та *Pinb* у пшениці (Gasparis et al, 2011) і їхніх ортологів, генів

Sina та *Sinb* у тритикале (Gasparis et al, 2013). Рівень транскриптів генів був знижений більш ніж на 80 % у Т1 і понад 90 % у поколіннях Т2–Т4 та залишався стабільним. Крім того, РНК-опосередковане глушіння одного з генів *Pin* або *Sin* одночасно знижувало експресію другого гена. Зниження рівня транскриптів обидвох генів привело до значного зменшення або відсутності як білків пуринодолінів, так і секалоіндолінів і збільшення твердості зерна пшениці. На відміну від результатів, отриманих з генами *Pin*, знижена експресія генів *Sin* і нижчий рівень білків секалоіндолінів не впливало на твердість зерна.

Продукти з високим вмістом резистентного крохмалю можуть покращити здоров'я людини та знизити ризик серйозних неінфекційних захворювань. РНКі використовували для зниження регуляції двох різних ізоформ ферменту розгалуження крохмалю *SBEII* (*SBEIIa* та *SBEIIb*) в ендоспермі зерна пшениці для підвищення вмісту амілози. Пригнічення експресії генів як *SBEIIa*, так і *SBEIIb* привело до збільшення вмісту амілози у крохмалі до >70 % (Regina et al, 2006). Ці результати вказують на те, що пшениця з високим вмістом амілози має значний потенціал для покращення здоров'я людини завдяки вмісту стійкого крохмалю.

Зменшення вмісту фітинової кислоти в зерні є основною метою селекції як для збільшення доступності мінеральних поживних речовин, так і для зниження навантаження фітатів на доквілля. Зниження рівня фітинової кислоти в зерні рису було досягнуто шляхом РНКі гена *Rino1* рисової синтази *Ins(3)P1*. У зерні рослин Т5 спостерігалось значне зменшення рівня білка *RINO1* на пізніх стадіях дозрівання. Більшість насіння Т5 містило вищу кількість неорганічних фосфатів без зниження загального рівня фосфору порівняно з нетрансгенним насінням (Kiwapo et al, 2006). У рису також було проведено опосередковане РНКі специфічне глушіння гена *IPK1*, який каталізує останню стадію біосинтезу фітинової кислоти (Ali et al, 2013a). У зерні трансгенних рослин Т4 виявлено 3,85-кратне зниження транскриптів *IPK1*, що корелює зі значним зменшенням рівня фітату та супутнім збільшенням кількості неорганічного фосфору. Таке насіння також накопичувало в 1,8 рази більше заліза в ендоспермі. Ці

ж автори провели РНКі-специфічне глушіння гена міо-інозитол-3-фосфат-синтази (*MIPS*), що каталізує першу стадію біосинтезу фітинової кислоти в рисі. Отримані трансгенні рослини Т3 показали зменшену в 4,59 рази експресію гена *MIPS*, що відповідало значному зниженню рівня фітату та одночасному збільшенню кількості неорганічного фосфату в зерні. У трансгенних рослин нижчі рівні фітату привели до 1,6-кратного збільшення концентрації заліза, що може корелювати з вищою його біодоступністю в ендоспермі зерна (Ali et al, 2013b).

Технологію РНКі можна застосувати для збільшення вмісту крохмалю в листі. Процес фосфорилування і дефосфорилування є вирішальним етапом його розкладання. Кількість крохмалю в листі кукурудзи було збільшено шляхом РНКі гена, який виявився гомологічним гену *Gwd* (глюкан, водна дикіназа) арабідопсису (Weise et al, 2012). Його вміст у модифікованих ліній був у 20 разів вищим, ніж у нетрансформованих, без впливу на загальну біомасу рослин.

Стійкість до біотичних стресів

Шкідники, такі як віруси, бактерії, гриби, нематоди та комахи становлять серйозну загрозу для сільськогосподарських рослин. РНКі використовується для отримання стійких до шкідників культур шляхом індукованого господарем глушінням генів (*host-induced gene silencing*, HIGS). HIGS – це біотехнологія, яка в основному базується на створенні трансгенних рослин, та дозволяє глушити специфічні гени шкідників або патогенів, які їх атакують, шляхом експресії гомологічних длРНК у рослині-господарі. Модифікована рослина транскрибує длРНК, які процесуються в кіРНК, які у свою чергу переносяться в рослинні патогени (Sang and Kim, 2020). Вирішальним кроком для успішної стратегії HIGS є ідентифікація відповідних цільових генів у збудника (Koch and Kogel, 2014). До найбільш цікавих технологій також належить вірус-індуковане глушіння генів (*virus-induced gene silencing* – VIGS), засноване на включенні сегмента гена рослини-господаря до складу вірусного геному для індукції РНКі та глушіння експресії гена-мішені на посттранскрипційному рівні (Akbar, 2022).

Стійкість до вірусів

Віруси рослин становлять значну загрозу для злакових культур і викликають приблизно 10–15 % втрат урожаю (Yu et al, 2022). Підвищити рівень антивірусного захисту можуть методи, спрямовані на активацію ключових компонентів механізму РНКі рослини та спрямування їх проти нуклеотидних послідовностей інвазивних нуклеїнових кислот патогенів. Одним із найпоширеніших підходів на цьому шляху є генетична трансформація рослин конструкціями, що містять смислові або антисмислові нуклеотидні послідовності, які копіюють нуклеотидні послідовності вірусного геному (Abdellatif et al, 2021; Akbar et al, 2022; Yu et al, 2022). Крім того, химерні шпилькові конструкції, що несуть послідовності з різних вірусів, успішно використовувалися для індукції множинної резистентності до цільових вірусів у трансгенних рослин (Halder et al, 2023). Подібно до химерних шпилькових конструкцій, що діють на різні віруси, химерні конструкції, що несуть послідовності різних генів одного вірусу, використовувалися для максимізації ефективності резистентності (Lacombe et al, 2021; Akbar et al, 2022). Як правило, для надання стійкості до певних штамів вірусів як мішені вибираються нуклеотидні послідовності, що кодуєть вірусні білки-супресори або білки, які відповідають за проникнення в клітину, поділ та/або поширення вірусу (Yu et al, 2022).

Wang та ін. (Wang et al, 2000) вперше використали РНКі для захисту ячменю від вірусу жовтої карликовості (BYDV-PAV). Рослини трансформували конструкцією, що містила певні послідовності BYDV-PAV. З 25 отриманих трансгенних ліній, дев'ять показали надзвичайну стійкість до вірусу. Це було оцінено як імунітет, оскільки вірус не можна було виявити в заражених рослинах за допомогою тесту ELISA або відновити в експериментах з живленням попелиці.

Досить часто для набуття стійкості до вірусів злакові рослини трансформували послідовністю цільового вірусу, в основному з гена, що кодує білок оболонки (CP) (Sivamani et al, 2002; Li, 2005; Ma et al, 2011; Zhou et al, 2012; Zhang et al, 2013; Cruz et al, 2014; Le et al, 2015; Guo et al, 2015; Shoup Rupp, 2016; Akbar, 2017). Цей

цільовий ген був використаний для підвищення стійкості до мозаїчної хвороби цукрової тростини, яка викликається вірусом мозаїки цієї рослини (SCMV) та/або вірусом мозаїки сорго (SrMV). Рівень стійкості трансгенних ліній становив 87,5 % за штучного зараження SrMV (Guo et al, 2015). Рослини м'якої пшениці сорту ROC22 були стабільно трансформовані геном CP вірусу смугастої мозаїки пшениці (WSMV) та отримано 11 трансгенних ліній. З п'яти проаналізованих – одна показала високу стійкість до інокуляції двома штамми WSMV (Sivamani et al, 2002). За аналогічних досліджень, усі рослини трансгенної пшениці генотипу 566B покоління T1, що несуть *WSMV-CP*, показали сильну стійкість до WSMV. Разом з тим, у поколіннях T2-T3 усі модифіковані рослини виявили трансгенне мовчання (Li, 2005). У подальших дослідженнях, за використання трансгенів білка CP вірусу WSMV, вдалося досягти ефектної резистентності у рослин даної культури, про що свідчила відсутність вірусної РНК у тканині. Стійкість до вірусу стабільно успадковувалася до T5 покоління (Cruz et al, 2014). Для підвищення стійкості до вірусу мозаїки *Triticum* (TriMV) пшеницю сорту Bobwhite трансформували конструкцією, що містила послідовності гена CP TriMV (Shoup Rupp et al, 2016). Отримано декілька ліній, які були стійкими, мали невелику кількість або взагалі не мали вірусної РНК. Стійкі лінії покоління T6 за результатами ПЛР у режимі реального часу та тесту ELISA показали високий рівень резистентності при зараженні вірусом.

Сприйнятливую інбредну лінію кукурудзи трансформували векторними конструкціями, що містять інвертовані повторювані послідовності різної довжини, націлені на ген CP вірусу карликової мозаїки кукурудзи (MDMV). З 19 ліній рослин T2, шість були оцінені як стійкі до MDMV, і 4 з них мали резистентність, яка суттєво відрізнялася від високостійкого контролю, тоді як стійкість інших 11 була значно покращена порівняно з вихідними рослинами (Zhang et al, 2011). Для підвищення стійкості до вірусу смугастості рису (RSV) була створена конструкція РНКі, яка містила послідовності гена CP і гена специфічного білка SP з RSV, яка була перенесена в два сприйнятливі сорти. Трансгенні рослини поколінь T5 і T7 були

сильно стійкими до вірусної інфекції (Zhou et al, 2012). Для боротьби з цим вірусом сконструювали три бінарні вектори РНКі на основі білка оболонки CP, специфічного білка SP і химерної послідовності гена CP/SP. Трансгенні лінії рису сорту Yujing6, що несли CP/SP-РНКі, були більш стійкими до двох ізолятів RSV, ніж одиничні лінії CP або SP-РНКі. Стійкість до вірусів стабільно успадковувалася в рослинах T2 (Ma et al, 2011). Для підвищення стійкості до вірусу мозаїки цукрової тростини (SCMV) рис трансформували касетою шпРНК, націленою одночасно на гени CP і Hc-Pro (допоміжний компонент гена протеїнази) SCMV. Отримані трансгенні рослини показали сильну стійкість за механічної інокуляції SCMV (Akbar et al, 2017).

Для підвищення стійкості до хвороби рисового тунгро, яка спричинена змішаною інфекцією бацилоподібного вірусу рису (RTBV) і сферичного вірусу рису (RTSV) були створені трансгенні рослини, здатні продукувати РНКі генів, що кодують білки оболонки CP1, CP2, CP3 або нуклеотидний трифосфатзв'язуючий білок (NTP) RTSV, які виявилися стійкими до обидвох вірусів одночасно. Аналіз трансгенних рослин T1 засвідчив, що рівні вірусних нуклеїнових кислот зменшилися у 100–500 разів у вищезазначених рослин порівняно з нетрансгенними (Le et al, 2015).

Віруси рослин кодують специфічні білки-реплікази, які дозволяють їм розмножуватися в клітині-господарі. Неструктурний білок Pns9 вірусу галової карликовості рису (RGDV) накопичується у включеннях віроплазми, які є структурами, що відіграють важливу роль у морфогенезі вірусу та зустрічаються в клітинах-господарях, інфікованих вірусами родини Reoviridae. Отримані трансгенні рослини рису, що експресують конструкцію РНКі, націлену на ген Pns9 RGDV, а саме *Trigger_G9*. Усі потомства від самозапилення трансгенних рослин мали сильну та спадкову стійкість до інфекції RGDV (Shimizu et al, 2012).

Трансгенні рослини з введеною конструкцією РНКі, націленою на гени вірусу карликовості рису (RDV): Pns6 (білок, пов'язаний з віроплазмою і рухом вірусу), P8 (головний зовнішній капсид) і Pns12 (білок, пов'язаний з віроплазмою), були повністю стійкими до RDV-інфекції, що свідчить про те, що ці білки є ключовими ком-

понентами на ранніх стадіях розповсюдження вірусу. Рослини з пригніченою експресією генів P8, Pns12 та Pns6 мали найсильнішу стійкість до RDV інфекції (Sasaya et al, 2014). У іншому дослідженні (Shimizu et al, 2009) для створення специфічних конструкцій РНКі, якими трансформували рослини рису, були використані білки Pns12 та Pns4 RDV. Потомство рослин з Pns12-специфічними конструкціями РНКі було сильно стійким до вірусної інфекції. Навпаки, резистентність була менш очевидною у випадку рослин з Pns4-специфічними конструкціями РНКі. Ці результати свідчать про те, що втручання в експресію білка, який є критичним для реплікації вірусу, такого як матриксний білок віроплазми Pns12, може бути ефективним способом контролю вірусної інфекції у злакових рослин.

Високий рівень стійкості до вірусу чорної смугастої карликовості рису (RBSDV) був отриманий у результаті трансформації рослин конструкціями для глушіння генів RBSDV S7-2 або S8, що кодують білки, які беруть участь у взаємодії рослини і вірусу. Гомозиготні трансгенні лінії T5, які містили або S7-2-РНКі, або S8-РНКі, показали високий рівень резистентності до RBSDV у польових умовах (Ahmed et al, 2017). Також були створені конструкції РНКі для спеціального націлювання на три гени RBSDV (S1, S2 і S6, що відповідно кодують РНК-залежну РНК-полімеразу, передбачуваний коровий білок, супресор глушіння РНК). Показано, що глушіння гена RBSDV S6 надало рису майже повний імунітет до RBSDV протягом восьми поколінь як за штучної інокуляції, так і в польових випробуваннях, тоді як РНКі гена S1 або S2 приводить лише до часткового підвищення стійкості (Feng et al, 2021). Також було виявлено, що РНКі гена S6 забезпечує високу стійкість до вірусу південної чорної смугастої карликовості рису (SRBSDV), нового виду, тісно пов'язаного з RBSDV (Feng et al, 2021). Створені трансгенні лінії рису, що містять конструкцію шпРНК, націлену на чотири гени RBSDV, зокрема S1, S2, S6 і S10 (зовнішній капсидний білок). Аналіз як за штучної інокуляції, так і в польових умовах трьох поколінь трансгенних ліній показав, що вони мали високу стійкість до інфекції RBSDV (Wang, 2016). Ці результати свідчать про те, що

довга шпРНК, націлена на кілька вірусних генів, може бути використана для створення стабільної та тривалої стійкості до вірусів у рису, а також інших видів злакових рослин. Трансгенні рослини рису, які містили тригерну плазмиду РНКі, що пригнічує експресію гена *P9-1* RBSDV були повністю стійкими до нього (Sasaya et al, 2014). Це додатково підтвердило, що гени, асоційовані з білками віроплазми, можуть бути мішенню для надання сильної стійкості до інфікуючих рослин реовірусів.

Також для РНКі використовували химерний фрагмент, що несе збережені послідовності трьох різних генів вірусу рваної карликовості рису (також менш відомий як вірус інфекційного галу рису) (RRSV) замість одного (Lacombe et al, 2021). Як цільові були обрані гени *sbgp1* (кодує білок руху), *s9gp1* (відіграє певну роль у передачі вірусу) та ген *S10gp1* (випадковим чином обраний серед генів без точної функції). З трьох відібраних трансгенних ліній рослин лише дві акумулювали кіРНК з одного або трьох фрагментів та характеризувалися сильним зниженням симптомів RRSV. Дослідники з Японії трансформували рослини рису конструкціями длРНК, спрямованими до різних ділянок геному вірусу смугастості рису (RSV). Трансгенні рослини, які несуть специфічну конструкцію глушіння гена білка капсиду (*pC3*) або гена білка пересування (*pC4*), були стійкими до вірусної інфекції, в той час як рослини, що містять конструкції до генів *pC2* (кодує глікопротеїн невідомої функції) або *p4* (великий неструктурний білок невідомої функції) не показали стійкості до вірусу (Shimizu et al, 2011). В подальшому були створені трансгенні рослини рису, що експресують длРНК генів *pC5* і *pC6* вірусу трав'янистої карликовості рису (RGSV), які є функціональними ортологами *pC3* і *pC4* RSV (Shimizu et al, 2013). Усі потомства трансгенних рослин мали сильну стійкість до інфекції RGSV.

Стратегія резистентності, отримана від патогенів, була використана для підвищення стійкості до вірусу смугастості кукурудзи (MSV) із застосуванням гена *rep*, який кодує багатofункціональний білок, асоційований з його реплікацією (Shepherd et al, 2007). Пробні експерименти показали значну стійкість до MSV – від високостійкої до імунної. Вектор експресії

шпРНК був сконструйований для націлювання на ген *P1* протеази вірусу карликової мозаїки кукурудзи (MDMV) і використаний для трансформації рослин (Zhang et al, 2010). Стійкість 3 трансгенних ліній T2 була оцінена в польових випробуваннях за подвійної інокуляції MDMV у двох середовищах і виявилася кращою, порівняно з нетрансформованим контролем, та істотно не відрізнялася від високорезистентної контрольної лінії H9-21. В подальших дослідженнях цих авторів (Zhang et al, 2013) було отримано 17 трансгенних ліній T2, з яких 15 було оцінено на стійкість до MDMV у польових випробуваннях. Показано, що всі 15 ліній виявили підвищену стійкість до MDMV порівняно з нетрансформованою батьківською лінією, з яких 6 ліній були визнані стійкими із середнім індексом захворювання нижче 25 %.

М'яку пшеницю сорту Hi-Line трансформували конструкцією для глушіння гена реплікази (*Nlb*) вірусу смугастої мозаїки пшениці (WSMV). Шість незалежних трансгенних ліній рослин були проаналізовані на стійкість до механічної інокуляції WSMV у поколіннях T3 та T4. Чотири лінії показали різний ступінь стійкості до WSMV – від більш легких симптомів, значної затримки розвитку симптомів або безсимптомного. Дві лінії виявили більш високу стійкість із дуже слабкими вірусними симптомами після інокуляції. У 72 та 32 % рослин цих ліній взагалі не було виявлено наявності вірусу та будь-яких симптомів розвитку хвороби протягом життєвого циклу рослин (Sivamani et al, 2000). Конструкція РНКі була розроблена для націлювання на ген білка ядерного включення (*Nla*) WSMV (Fahim et al, 2010). Десять із шістнадцяти ліній T1 показали повну стійкість до WSMV, яку класифікували як імунітет. У трансгенних рослин накопичення вірусної РНК було знижено більш ніж у 105 разів порівняно з чутливими контрольними групами.

Повідомлялося про створення трансгенних рослин, стійких до рисового тунгро (RTBV) з використанням конструкції РНКі-*ORF IV RTBV* (Tuagi et al, 2008). У двох трансгенних ліній спостерігалися різні реакції резистентності проти RTBV. У одній відмічали початкове швидке накопичення вірусу після інокуляції, порівняно з нетрансформованим контролем, з наступним

різким зниженням, у результаті чого спостерігались в 50 разів нижчі вірусні титри. У іншій лінії вірусні титри поступово підвищувалися від низького до майже 60 % до рівня контролю. Перша лінія показала симптоми тунгро, подібні до нетрансформованих ліній, тоді як друга лінія виявила надзвичайно слабкі симптоми інфекції. Щоб отримати стійкість до RTSV, рослини рису трансформували за допомогою конструкцій, призначених для експресії нетрансльованої смислової або антисмислової РНК RTSV. Три з чотирьох ліній трансгенних рослин, що експресують нетрансльовану РНК RTSV у смисловій орієнтації, і дві з чотирьох ліній, що експресують РНК RTSV в антисмисловій орієнтації, виявили затримку накопичення вірусу та низьку його передачу (Verma et al, 2012). Повідомлено про створення трансгенних рослин рису, стійких до RTBV та RTSV одночасно. Конструкцію, яка містить 300 п.н. ДНК RTBV і 300 п.н. кДНК RTSV, клонували у бінарну плазмиду для генерації РНКі обидвох вірусів. У модифікованих рослин Т1 рівні вірусних нуклеїнових кислот впали у 100–500 разів порівняно з нетрансгенним контролем (Sharma et al, 2018).

Стійкість до грибів і бактерій

Грибні патогени спричиняють значні втрати врожаю злакових культур у всьому світі і технологія РНКі широко використовується для отримання рослин, стійких до них (Bilir et al, 2022). HIGS на основі РНКі забезпечує новий, інноваційний підхід до боротьби з хворобами рослин, спричиненими грибами, оскільки знижує експресію ключових генів патогенів, які необхідні для розвитку хвороби у господаря (Qi et al, 2019). Крім того, HIGS можна використовувати для отримання стійкості до декількох хвороб культури, оскільки можливо розробити конструкції, що містять численні («складені») трансгени РНКі, створені проти різних патогенів (Nowara et al, 2010). Ще одна зручність полягає в тому, що трансгени можуть бути розроблені як «специфічні для раси», або як трансгени широкого спектру дії на основі ступеня збереження послідовності в межах цільового регіону. Мачадо та ін. (Machado

et al, 2018) висвітлили нещодавні досягнення в методах боротьби з грибними хворобами злакових рослин на основі РНКі та підкреслили, що, незважаючи на деякі недоліки, HIGS став багатообіцяючим новим підходом до боротьби з цими хворобами.

Використання HIGS для боротьби з *Fusarium graminearum* було вперше продемонстровано Кох та ін. (Koch et al, 2013). Для сайленсингу були застосовані грибні гени цитохрому Р450 ланостеролу С-14а-деметилази (*CYP51*), які необхідні для біосинтезу ергостеролу. Створені трансгенні лінії ячменю, що експресують дЛРНК, комплементарну трьом генам *F. graminearum* – *CYP51A*, *CYP51B* і *CYP51C*, були високостійкими до грибної інфекції. Як метод підвищення стійкості до фузаріозу колоса та розвитку гриба на сходах пшениці була застосована РНКі гена хітинсинтази (*Chs3b*), який контролює біосинтез хітину *Fusarium graminearum* (Cheng et al, 2015). Виявлено, що три шпилькові конструкції РНКі, що відповідають різним ділянкам *Chs3b*, пригнічують цей ген у грибів, що колонізують проростки та колоски пшениці. Спільна експресія цих конструкцій у двох незалежних трансгенних лініях елітних сортів пшениці забезпечила високі рівні стабільної резистентності як до фузаріозу колоса, так і сходів впродовж Т3–Т5 поколінь. В оглядовій роботі (Sang and Kim, 2020) наводиться не менше 11 варіантів ефективних технологій захисту рослин із використанням РНКі, зокрема ячменю та пшениці, від *Fusarium graminearum* з глушінням експресії генів *CYP 51* та *Chs3b*. При дослідженні молекулярно-генетичних механізмів підвищення стійкості рослин пшениці до *F. graminearum*, за використання природних полікомпонентних біостимуляторів, методом дот-блот-гібридизації показано, що біостимулятори викликають значне збільшення виробництва в рослинних клітинах протекторних кі/міРНК та підтверджено механізм епігенетичного упадкування стійкості оброблених рослин до цього мікрومیцету (Tsygankova et al, 2020).

Дезоксиніваленол (DON) є найпоширенішим мікотоксином *Fusarium*, виявленим у зерні злаків, а також є критичним фактором вірулентності для інфекції *F. graminearum*. Китайські дослідники (Wang et al, 2020) застосували

HIGS для отримання трансгенних рослин пшениці, стійких до забруднення як *F. graminearum*, так і DON шляхом одночасного глушіння трьох генів *F. graminearum*. Як цільові гени для HIGS були обрані *SGE1*, що кодує критичний регулятор, який контролює біосинтез DON, *STE12*, що кодує ключовий транскрипційний фактор для формування структури проникнення і *PPI*, що кодує незамінну фосфатазу, на основі яких була розроблена химерна шпилькова конструкція РНКі, яка могла одночасно заглушити три гени-мішені. Чотири з 16 отриманих трансформантів продемонстрували повільнішу швидкість росту (заглушення *PPI*), знижену продукцію DON (замовчування *SGE1*) та зменшення інфекційних структур на лемі пшениці (заглушення *STE12*). Конструкції HIGS, націлені на гени протеїнкінази *F. graminearum* 00677 і 08731, а також гени, що кодують *CYP51A*, *CYP51B* і *CYP51C* у трансгенній *Brachypodium distachyon* надали стійкість до цього гриба. Усі трансгенні лінії T2 показали сильну резистентність до *F. graminearum* (He et al, 2019). Ці результати свідчать, що Fg00677 і Fg08731 є ефективними мішенями для HIGS і можуть бути застосовані для створення трансгенних рослин зернових культур, стійких до *F. graminearum*. Стабільні трансгенні рослини пшениці, що несуть шпилькову конструкцію РНКі до гена β -1,3-глюкансинтази *Gls1 Fusarium culmorum* або потрійну комбінацію *Gls1* з двома іншими цільовими генами (*Fgl1*-секретованої ліпази, *ChsV*- хітинсинтази V, MAP-кінази *Fmk1*) також продемонстрували підвищену стійкість до фузаріозу при інокуляції листків та колоса (Chen et al, 2016).

Цікаві результати захисту рослин кукурудзи від фузіозин-продукуючих штамів грибів *Fusarium verticillioides* були отримані з використанням антисмислових конструкцій до відповідних генів *FUM1* та *FUM8*, що дозволило багаторазово знизити концентрацію токсину (Johnson et al, 2018). Декілька з отриманих трансформантів показали знижену експресію гена *FUM1* і зменшення продукування фумонізу FB1 у 24–3675 разів. Подібне зниження виробництва фумонізу було виявлено і у трансформантів РНК-конструкцій із сегментами *FUM8*, іншого гена біосинтезу токсину (зниження фумонізу FB1 у 3,5–2240 разів).

Бура листкова іржа пшениці, викликана грибом *Puccinia triticina* (*Pt*), є однією з найсерйозніших загроз для сталого виробництва пшениці у світі. Панвар та ін. (Panwar et al, 2013b) була розроблена система тимчасової трансформації для індукції HIGS проти цього збудника. Після інфекції *Pt* листки рослин пшениці, які тимчасово експресують шпилькові РНК-генеруючі конструкції, спрямовані на гени патогенності *Pt* – мітоген-активовану протеїнкіназу 1 (*PtMAPK1*), циклофілін (*PtCYC1*), або кальциневрин b (*PtCNB*) показали зниження на 51–68 % симптомів хвороби і зниження біомаси грибів на 59–69 % через 10 днів після інфікування. Рослини пшениці також виявили знижені симптоми після суперінфекції стебловою іржею (*Puccinia graminis*) або жовтою смугастою іржею (*Puccinia striiformis*). У наступних дослідженнях цієї групи стабільна експресія шпилькових конструкцій РНКі з гомологією до послідовності MAP-кінази (*PtMAPK1*) або гена, що кодує циклофілін (*PtCYC1*), у чутливих рослинах пшениці привела до ефективного глушіння відповідних генів у взаємодіючому грибі, що обумовило стійкість трансгенних рослин покоління T2 (Panwar et al, 2018). Дослідники (Qi et al, 2018) використали HIGS, опосередкований вірусом смугастої мозаїки ячменю (BSMV), щоб заглушити ген протеїнкінази A (*PsCPK1 Puccinia striiformis f. sp. tritici* (*Pst*)). Вони продемонстрували, що *PsCPK1* є важливим фактором патогенності для *Pst* і його нокаун привів до зниження вірулентності гриба. Дві трансгенні лінії, що експресують конструкцію РНКі, показали високі рівні стабільної стійкості до *Pst* в поколіннях T3 та T4. В подальшому ця група дослідників ідентифікувала ефекторний ген, багатий на гліцин-серин, *PstGSRE1*, який індукується під час ранньої інфекції. Трансгенна експресія конструкцій *PstGSRE1*-РНКі у пшениці значно знижує вірулентність *Pst*. Показано, що *PstGSRE1* діє на транскрипційний фактор *TaLOL2*, позитивний регулятор імунітету пшениці (Qi et al, 2019a). Створені лінії трансгенної пшениці, що експресують дРНК, націлену на транскрипти гена *FUZ7 Pst*, який є важливим фактором патогенності, що регулює інфекцію та розвиток *Pst*. Конструкція *PsFUZ7*-РНКі, стабільно експресована у двох незалежних трансгенних

ліній пшениці, надає сильну стійкість до *Pst* (Zhu et al, 2017). Для дослідження функції гена пшениці *CSN5* (сигналосома конститутивного фотоморфогенезу 9, COP9) у відповіді на зараження *Pst* отримали 10 трансгенних ліній покоління T1, що глушать *TaCSN5*, використовуючи технологію РНКі (Baі et al, 2021). Лінії *TaCSN5*-РНКі виявляли підвищену стійкість до *Pst*. Крім того, біомаса грибів була зменшена на 8–20 %. Стабільні трансгенні рослини покоління T4 з приглушенням *TaCSN5* показали стійкість широкого спектру до кількох рас гриба.

Очевидний ефект HIGS показаний у ячменю, зараженого грибом *Blumeria graminis f. sp. hordei* та пшениці, зараженої *B. graminis f. sp. tritici* (Nowara et al, 2010). Трансгенні рослини цих культур, що експресують дРНК для глушіння генів 1,3-β-глюканозилтрансферази (*GTF1* і *GTF2*) виявили знижені симптоми борошнистої роси або утворення/розвитку гаусторій і, отже, більшу стійкість до біотрофного збудника. Крім того, опосередковане HIGS націлювання на грибний ефекторний ген *Avra10* зменшило кількість функціональних гаусторій всередині епідермальних клітин у сприйнятливого сорту ячменю (Nowara et al, 2010). Також встановлено, що мутантні алелі гена *Mlo* (Mildew-resistance locus) викликають резистентність широкого спектру до збудника борошнистої роси у ячменю. Була вивчена можливість індукції стійкості широкого спектру до цього збудника за допомогою РНКі ортолога *Mlo* ячменю у пшениці з використанням індукованого вірусом глушіння генів (VIGS). Виявлена чітка кореляція між резистентністю та накопиченням *Mlo*-специфічних кіРНК, що підвищило можливість отримання стійкості до борошнистої роси у пшениці шляхом РНКі (Riechen, 2007; Va' rallyay et al, 2012). Нещодавно розроблені технології редагування генів використовуються для досягнення аналогічних ефектів. Наприклад, створені високостійкі до зараження борошнистою росою рослини пшениці з одночасним нокаутом трьох гомеологів *TaMlo* TALEN (ефекторна нуклеаза, подібна до активатора транскрипції). Також отримано трансгенні рослини пшениці, які несуть мутації в алелі *TaMLO-A1* за допомогою технології CRISPR-Cas9 (Wang et al, 2014).

Створені стабільні трансгенні лінії пшениці РНКі для одночасного пригнічення трьох генів *B. graminis f. sp. tritici*, включаючи *SvrPm3a1/fl* (фактор вірулентності, що бере участь у пригніченні гена стійкості до борошнистої роси *Pm3*), *Bgt_Bcg-6* і *Bgt_Bcg-7*. Показано, що всі цільові ефектори пригнічуються HIGS, що приводить до зниження вірулентності грибів на дорослих рослинах пшениці (Schaefer et al, 2020).

Націлювання на гени метаболізму жирних кислот через РНКі виявилось важливою стратегією для формування толерантності до хвороб у різних злакових культур. Яра та ін. (Yaga et al, 2007) створили трансгенні рослини рису, дефіцитні за ліноленовою кислотою (18:3), з двома спільно пригніченими генами десатурації ω-3 жирних кислот, *FAD7* і *FAD8*. Ці рослини показали підвищену стійкість до гриба *Magnaporthe grisea*. Крім того, у трансгенних рослин виявлено пригнічення експресії генів, пов'язаних з патогенезом, що реагують на жасмонову кислоту, *PBZ1* і *PR1b M. grisea*. РНКі-опосередкований нокаут гена *SSI2* (десатурази жирних кислот) рису знизив рівень олеїнової кислоти (18:1) і підвищив рівень стеаринової кислоти (18:0), що вказує на те, що *SSI2* відповідає за жирову активність кислотної десатурази. Крім того, рослини *OsSSI2* показали помітно підвищену стійкість до гриба *Magnaporthe grisea* та бактерій *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* (Jiang et al, 2009). Чжу та ін. (Zhu et al, 2017) використали націлювання на три гени патогенності *Magnaporthe oryzae*, *MoABC1*, *MoMAC1* і *MoPMK1* для перевірки ефективності тимчасового HIGS у рисі. Комбіноване введення послідовностей грибних генів у смисловій та антисмисловій орієнтаціях, опосередковане векторами глушіння вірусу мозаїки ячменю, показало, що кількість мРНК цільових генів була зменшена і гальмувався розвиток хвороби.

Технологія HIGS була застосована для трансформації овсяниці високої конструкціями РНКі з чотирьох «основних» генів *Rhizoctonia solani* (гени, що кодують РНК-полімеразу, імпортин бета-1 субодиницю, комплексну субодиницю Cohesin Psm1 і убіквітин E3 лігазу), для їх глушіння і пригнічення грибної інфекції (Zhou et al, 2016). З 19 отриманих трансгенних рослин шість показали значно покращену стійкість

проти *R. solani*, а розмір ураження зменшився на 90 %. Прикладом того, як декілька генів патогенів можуть бути одночасною мішенню для одного трансгену HIGS, є дослідження Тіварі та ін. (Tiwarī et al, 2017), які трансформували рис за допомогою шпилькової конструкції РНКі, яка містила два злиті гени Мар-кінази1 *Rhizoctonia solani* – *RPMK1-1* і *RPMK1-2*, які необхідні для формування апресоріїв. Оцінка трансгенних ліній виявила значне зниження рівня грибної інфекції порівняно з нетрансформованим контролем.

Для зменшення забруднення кукурудзи мікотоксинами, зокрема афлатоксинами, найпотужнішими канцерогенними вторинними метаболітами, Масанга та ін. (Masanga et al, 2015) трансформували рослини шпильковою конструкцією, націлену на транскрипційний фактор біосинтезу афлатоксину *aflR Aspergillus flavus* і повідомили, що експресія *aflR* у трансгенних рослин була знижена, а вміст афлатоксинів зменшився у 14 разів, порівняно з нетрансформованими рослинами. Такаре та ін. (Thakare et al, 2017) визначили, що ген *aflC* кодує фермент на шляху біосинтезу афлатоксину *A. flavus*, а потім трансформували рослини кукурудзи конструкцією РНКі, націлену на цей ген. Після зараження патогеном афлатоксин не можна було виявити в зерні трансгенних рослин, тоді як навантаження токсинів досягало тисяч частин на мільярд у вихідних рослин. Також у кукурудзи ген *aflM A. flavus*, що кодує версікокориндгидрогеназу, ключовий фермент, який бере участь у шляху біосинтезу афлатоксину, був обраний як мішень для глушіння за допомогою HIGS (Ruang et al, 2020). Зерно трансгенних ліній Т1–Т4 показало знижений вміст афлатоксину та значно вищі рівні специфічних для гена *aflM* кіРНК в тканинах листків.

Стратегії, опосередковані РНКі, також успішно застосовуються для створення трансгенних рослин, стійких проти різних бактеріальних хвороб (Kaur et al, 2021; Yu et al, 2022). Хоча бактерії не мають механізму РНКі подібно до еукаріотів, вони мають механізм регуляції генів, які використовують молекули РНК. До них відносяться РНК CRISPR, які пригнічують поглинання чужорідної ДНК і малі РНК, які зв'язуються з білками або з парою основ цільової РНК. Іншим підходом до боротьби з

бактеріальними збудниками є використання HIGS. Ген рису *OsδN3* забезпечує сприйнятливність рослин до бактеріального опіку листя, викликаного *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* штамму РХО99А (Yang et al, 2006). Трансгенні рослини, отримані за технологією HIGS, з пригніченою експресією гена *OsδN3*, були стійкими до цього штаму *X. oryzae*.

Стійкість до комах

РНКі також застосовувалася для боротьби з комахами-шкідниками, які приводять до значної втрати врожаю (Katoch et al, 2013; Zhang et al, 2017; Yu et al, 2022). Деякі комахи, зокрема Coleoptera (жуки), зарекомендували себе високочутливими до длРНК (Baum and Roberts, 2014), так що лише невеликі кількості длРНК, що приймаються, можуть індукувати РНКі, викликаючи як нокдаун транскриптів, так і важливих цільових генів смертності комах. Особливий аспект РНКі полягає в тому, що в цих високочутливих комах длРНК не тільки здатна проникати в клітини кишечника, але й поширюватися на інші тканини, щоб індукувати системну РНКі (Joga et al, 2016).

Баум та ін. (Baum et al, 2007) першими застосували РНКі для боротьби з жосткокрилими комахами-шкідниками. Вони годували личинки західного кукурудзяного жука (*Diabrotica virgifera virgifera LeConte*) за штучною дієтою, доповнену специфічними длРНК, для скринінгу великої кількості генів, які можуть бути задіяні як ефективні мішені. Серед досліджених генів було ідентифіковано 14, нокдаун яких приводив до загибелі личинок. Шляхом пероральної доставки синтетичної длРНК за штучної дієти, а також шляхом споживання трансгенних рослин кукурудзи, отриманих для експресії длРНК, спрямованої проти гена *V-ATPaseA* (вакуольна АТФаза), досягнуто високої смертності личинок. Також для боротьби з цим жуком як гени-мішені були обрані *ssj1* і *ssj2*, які кодують мембранні білки гладкого перегородкового з'єднання, розташованого у слизовій оболонці кишечника комах. Трансгенні рослини, що експресують длРНК, націлену на ці гени, показують інсектицидну активність і значний захист рослин від пошкодження кукурудзяним жуком (Hu et al, 2016). Бологнесі та ін. (Bolognesi et al, 2012) вибрали

ортолог *Snf7* (DvSnf7), який кодує важливий білок, що бере участь у внутрішньоклітинному переносі у цього жука. Показано, що пригнічення *Snf7* поширюється на тканини за межі середньої кишки впродовж 24 год після прийому длРНК. Ці події (поглинання длРНК, пригнічення цільової мРНК і білка, системне поширення, пригнічення росту та можлива смертність) складають загальний механізм дії, за допомогою якого длРНК *Snf7* впливає на кукурудзяного жука через пероральне введення, і дають зрозуміти, як цільові длРНК загально активні проти комах.

У трансгенного ячменю длРНК, націлена на ген *shp* (структурний білок оболонки, основний компонент процесу проникнення стилету) великої зернової попелиці (*Sitobion avenae*), ефективно знижує рівень її розмноження та виживання, а ефект може передаватися впродовж семи поколінь (Abdellatif et al, 2015). Технологію РНКі для боротьби з *Sitobion avenae* було примінено Ху та ін. (Xu et al, 2014), які використали як цільовий ген карбоксилестерази (*CbE E4*) шкідника. Було отримано трансгенні лінії пшениці, що експресують длРНК *CbE E4 S. avenae*, та годували ними личинки попелиць. Експресія гена *CbE E4* у комах була знижена на 30–60 %, а кількість попелиць, вирощених на трансгенних рослинах, була нижчою, ніж їх кількість, вирощених на нетрансгенних рослинах. У подальших дослідженнях цих авторів (Xu et al, 2017) був клонований *lmf2*-подібний фрагмент гена фактора дозрівання ліпази зернової попелиці, який був використаний для трансформації пшениці. Експресія *lmf2*-подібного гена достовірно знижувалася на 27,6 % на п'яту добу та на 57,6 % на 10-ту добу після згодовування трансгенних рослин. Загальна кількість попелиць, утворених на модифікованих рослинах, була меншою, ніж кількість утворених на контрольних рослинах, і різниця стала значною через 2 тижні. Результати досліджень, отримані китайськими вченими (Zhao et al, 2018), вказують на те, що опосередкована рослинами РНКі гена хітинсинтази 1 (*CHS1*) зернової попелиці також забезпечує стійкість м'якої пшениці до комах. Після годування трансгенними лініями Т3 рівень експресії *CHS1* у зернової попелиці знизився на 45–50 %, а чисельність попелиць зна-

чно зменшилася у трансгенних лініях Т4 і Т5 в польових умовах. Трансгенні рослини пшениці, що експресують 198 п.н фрагмент длРНК, комплементарної гену білка цинкового пальця (*SaZFP*) зернової попелиці дозволяють ефективно підвищувати її смертність та знижувати щоденну плодючість (Sun et al, 2019).

Для боротьби з бурою рисовою цикадкою (*Nilaparvata lugens*) створені трансгенні рослини рису, що експресують шпилькову длРНК, націлену на ген *EcR* (рецептор екдизону). У німф *N. lugens*, яких годували трансгенними рослинами, спостерігали ефективну РНКі та зниження виживаності німф на 44–66 % (Yu et al, 2014). Три гени рисової цикадки (ген транспортера гексози *HT1*, ген карбоксипептидази *car* і ген трипсиноподібної серинової протеази *try*), які сильно експресуються в середній кишці *N. lugens*, були використані для розробки конструкцій длРНК для трансформації рису. Коли німф годували модифікованими рослинами, що експресують длРНК, рівні транскриптів цільових генів у середній кишці були знижені, а їх виживаність зменшувалася (Zha et al, 2011). Популяції багатойдного клопа-мірида (*Apolygus lucorum*) були значно зменшені після згодовування трансгенної кукурудзи, яка містила конструкцію РНКі, спрямовану на глушіння гена вакуольної АТФази *AlucV-ATPase-E* (Liu et al, 2019).

Стійкість до паразитичних нематод та рослин-паразитів

Одним із найбільш перспективних підходів до біоконтролю паразитичних нематод у злакових культур є РНКі (Lilley et al, 2007). Використовується стратегія, за якої нематоди, харчуючись рослинами, споживають длРНК, яка потрапляючи в їхній кишечник, запускає процес РНКі проти їхніх власних генів, таким чином знижується плодючість і спричиняється смертність паразитів. Цього можна досягти розробкою трансгенних рослин, здатних виробляти необхідну длРНК, яка націлена на різні гени домашнього господарства нематод, а також на гени паразитування або ефекторні гени (Dutta et al, 2015). Рослини пшениці трансформували сімома генами-мішенями цистої нематоди зернових *Heterodera avenae* для аналізу HIGS. Трансгенна експресія генів галектину, катеп-

сину L, *var1*, серпіну, *flp12*, RanBPM і хітинази привела до зниження розмноження *H. avenae* на 33–72 % у поколінні T1. Подібний рівень стійкості, що спостерігався у рослин T2, вказує на постійний ефект HIGS у наступних поколіннях. Цікаво, що цисти, виділені з рослин-РНКі, мали менший розмір із напівпрозорою кутикулою порівняно з нормальним розміром, темно-коричневими контрольними цистами, що свідчить про затримку розвитку *H. avenae* через HIGS (Dutta et al, 2020). Також вчені використали РНКі для глушіння 4 генів *Heterodera avenae*, а саме ядерного гормонального рецептора, білка, що зв'язує плодоналіт, інтрон-зв'язуючий білок і епсин (Gantasala et al, 2015). Вони повідомили, що заглушення цих генів привело до зменшення кількості самок і яєць на 71, 26 і 60 % через глушіння генів епсину, інтрон-зв'язуючого білка і білка, що зв'язує плодоналіт, відповідно (Gantasala et al, 2015). Трансгенна лінія пшениці, що містить конструкцію HIGS для глушіння гена анексину *Heterodera avenae*, виявила знижену приживлюваність нематод на рослинах (Chen et al, 2015).

У спільних дослідженнях українських та британських вчених (Blyuss et al, 2019; Tsyganova et al, 2020) показано доцільність використання полікомпонентних біостимуляторів, отриманих з метаболітів різних ґрунтових стрептоміцетів, для захисту пшениці сорту Зимоярка від *H. avenae* шляхом індукції РНКі у рослинах. Використання дот-блот-гібридації виявило, що біостимулятори, зокрема Аверком, Аверком нова-2, Фітовіт та Віолар викликають значне збільшення виробництва в рослинних клітинах кі/міРНК (у 1,7–3,09 рази). Ці малі РНК дуже ефективні для глушіння трансляції мРНК нематоди, що має комплементарні послідовності, таким чином зменшуючи рівень зараженості та підвищення стійкості рослин пшениці до паразиту. Дуже важливий момент полягає в тому, що біостимулятори, використані в цьому дослідженні, є натуральними продуктами ґрунтових стрептоміцетів, які здатні надавати цілеспрямований захист проти нематоди, забезпечуючи тим самим безпечний і ефективний спосіб біоконтролю. Результати цих досліджень довели, що механізм біопротекторної дії мікробних біостимуляторів полягає в ін-

дукції синтезу ендogenousних малих регуляторних кі/міРНК з протипаразитарними властивостями.

Рослини рису сильно уражуються галовою нематодою *Meloidogyne graminicola*. Для боротьби з нею за допомогою HIGS були використані гени, що кодують FMRF амідоподібні пептиди, *flp-1* і *flp-12* *M. graminicola*. У трансгенних рослин виявлено значне зменшення загальної кількості ендopаразитів на 31–50 % для *Mg-flp-1* і на 34–51 % для трансгенів *Mg-flp-12*. Кількість яєчних мас на рослину та яєць на яєчну масу також значно знизилася у модифікованих рослин, що в кінцевому підсумку вплинуло на коефіцієнт розмноження нематод (Hada et al, 2020).

Для надання стійкості до паразитичного бур'яну *Striga asiatica* були отримані трансгенні рослини кукурудзи, які експресують дЛРНК, для глушіння генів, необхідних для її виживання. П'ять генів *S. asiatica* (гени жирних кислот, ароматичних амінокислот, біосинтезу аденозинмонофосфату (АМФ), морфогенезу вакуоль) були обрані як мішені для створення 13 конструкцій РНКі та отримані 55 трансгенних ліній кукурудзи. Повідомлено, що жодна з 11 досліджених ліній не була явно стійкою до паразитування *S. asiatica* впродовж 4–5 тижнів після зараження. Деякі рослини *Striga* змогли розвиватися та виживати на всіх перевірених трансгенних матеріалах. Проте, виявлено, що *Striga* росте повільніше, коли приєднується до модифікованої кукурудзи, принаймні у половині протестованих рослин (de Framond et al, 2007).

Стійкість до абіотичних стресів

Посуха є одним із найпоширеніших екологічних стресів, який обмежує продуктивність злакових культур. Рецептор для активованої С-кінази 1 (RACK1) є висококонсервативним каркасним білком із різноманітними функціями та відіграє важливу роль у регуляції росту та розвитку рослин. Трансгенні рослини рису, в яких експресія гена *RACK1* була пригнічена РНКі, були вивчені для з'ясування можливих функцій *RACK1* у відповідях на посуховий стрес. ПЛР-аналіз у режимі реального часу показав, що експресія *RACK1* у трансгенних рослин інгібується більш ніж на 50 %, а стійкість до посухи була значно вищою порівняно з нетрансгенними рослинами (Li et al, 2009).

РНКі-опосередковане глушіння гена *GRXS17* покращує посухостійкість рису (Hu et al, 2017). В умовах стресу від посухи трансгенні рослини покоління T2 показали знижену експресію *OsGRXS17*, нижчу швидкість втрати води та продигової провідності, вищий відносний вміст води та посилення виживання порівняно з контрольними нетрансгенними рослинами.

РНКі гена проліндегідрогенази (*ProDH*), пов'язаного з катаболізмом проліну, приводила до підвищення його вмісту і, як наслідок, рівня толерантності рослин кукурудзи до абіотичних стресів (Mykhalska et al, 2014). Трансгенні рослини T0–T4 накопичували у 1,5–9,0 разів більше проліну і відрізнялися від контрольних підвищеною толерантністю до водного дефіциту та засолення, а також характеризувалися вищими показниками біомаси. Аналогічні результати були отримані у ярої та озимій пшениці (Dubrovna et al, 2020, 2022). Показано, що наявність у трансгенних рослин T1–T3 дволанцюгового РНК-супресора гена *ProDH* приводить до збільшення рівня накопичення проліну як за оптимальних, так і стресових умов (2,6–4,1 раза) та підвищення толерантності до дії ґрунтової посухи. Для підвищення стійкості до засолення були створені трансгенні рослини рису, що несли конструкцію РНКі для глушіння гена *RPK1* (багатий на лейцин ген протеїнкінази) (Li et al, 2020). Проростки рису *OsRPK1*-РНКі показали більш високу стійкість до засолення, ніж нетрансгенні рослини. Вміст проліну в модифікованих рослинах був значно вищим, а ступінь пошкодження цитоплазматичної мембрани, вміст малонного діальдегіду та відносна провідність були значно нижчими, ніж у вихідних рослин.

Висновки

На сьогодні РНКі стала дієвим інструментом, що використовується не тільки для розшифровки функції генів, але й для отримання рослин з поліпшеними і новими ознаками шляхом маніпуляції як бажаними, так і небажаними генами. РНК-опосередковане глушіння генів вважається відносно безпечним, неінвазивним та досить зручним, оскільки отримана РНКі-рослина не містить трансгенного білка і призначена для експресії лише некодуючих РНК. Таким чином, трансгенні рослини з по-

ліпшеними ознаками на основі РНК є набагато безпечнішими для споживання людиною, ніж культури з надмірною експресією білків і не потребують дослідження гострої пероральної токсичності та оцінки засвоюваності введеного компонента РНК (Kaur et al, 2021).

Технологія РНКі використовується у злакових культур не тільки для підвищення продуктивності (біомаса і урожайність зерна), але й для підвищення їхньої поживної цінності (збагачення необхідними мінералами, вітамінами, жирними кислотами та амінокислотами). Також вона застосовується для отримання рослин з підвищеною толерантністю до різних абіотичних (особливо посухи) та біотичних стресів, таких як атаки патогенів та шкідників (віруси, бактерії, гриби, комахи та нематоди). Дані щодо функціонування механізмів РНКі дозволяють розробити дуже ефективні стратегії боротьби з комплексом шкідливих організмів у агроценозі, що сприяє підвищенню врожайності злакових культур, уникаючи при цьому застосування екологічно небезпечних пестицидів. Можливості, надані технологією РНКі для сільського господарства, збагачують генетичний пул рослин і розширюють спектр ознак, які можуть бути передані шляхом інтрогресії стабільних трансгенних РНКі-рослин в комерційні культури, отримання покращених сортів з багатьма характеристиками, які неможливо отримати в одному сорті шляхом традиційної селекції.

Поява передових інструментів, таких як мікрочипи та глибоке сиквенування, дозволяє розширити межі застосування РНКі для цілеспрямованого глушіння генів, щоб покращити різні ознаки злакових рослин. Це також може бути досягнуто поєднанням корисних властивостей РНКі з іншими передовими та інноваційними технологіями, такими як пірамідкування генів та їх редагування. Незважаючи на деякі обмеження, стратегії поліпшення злакових рослин, засновані на коротких некодуючих РНК, мають величезний потенціал для підвищення їхньої продуктивності, поліпшення поживних властивостей та стійкості до стресових чинників довкілля.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить результатів будь-яких досліджень з використанням людей і тварин в якості об'єктів.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність будь-якого конфлікту інтересів.

Фінансування. Публікація містить результати досліджень, проведених в рамках фінансованого Кабінетом Міністрів України проекту «Розроблення сучасних методів маркер-допоміжної селекції та технологій коротких інтерферуючих РНК для створення високопродуктивних сортів-інновацій озимої пшениці з поліпшеною якістю зерна, стійких до екологічних стресів». (КПКВК 6541230; № держреєстрації 0123U100780).

USING OF RNA INTERFERENCE TECHNOLOGY TO IMPROVE ECONOMICALLY VALUABLE CHARACTERISTICS OF CEREAL CROPS

O.V. Dubrovna, S.I. Mykhalska, A.G. Komisarenko

Institute of Plant Physiology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Vasylykivska st. 31/17, Kyiv, 03022, Ukraine

E-mail: dubrovny@ukr.net

RNA interference (RNAi) is a new potential tool for plant breeding by introducing small non-coding RNA sequences that can silence gene expression in a sequence-specific manner. The ability to reduce the expression of a specific gene provides the possibility of acquiring a new characteristic by eliminating or accumulating certain plant traits, which leads to biochemical or phenotypic changes that the original plants do not have. This literature review describes the progress achieved over the past decades in the application of RNAi for the creation of cereal crops with improved economically valuable traits. The main stages of the gene silencing mechanism, mediated by short interfering RNAs (siRNAs), the features of their biogenesis, the mode of action, and distribution are briefly presented. Numerous examples of the development of various biotechnological approaches to improving cereals using gene transformation and exogenous double-stranded RNA molecules are summarized. The possibility of using RNAi technology to change the agronomic characteristics of plants, enhance the nutritional value and quality of the grain, and reduce the number of toxic compounds and allergens is highlighted. Considerable attention is paid to the practical results of various applications of RNAi to increase the resistance of grain crops to biotic stress factors, in particular, viruses, bacteria, fungi, insect pests, and nematodes. Examples of the use of siRNA-mediated RNAi to improve cereal resistance to abiotic stresses, including drought and salinity, are given.

Key words: cereal crops, RNA interference, transgenic plants, agronomic traits, grain quality, resistance to abiotic and biotic stresses.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Abdellatef E, Kamal NM, Tsujimoto H (2021) Tuning Beforehand: A Foresight on RNA Interference (RNAi) and In Vitro-Derived dsRNAs to Enhance Crop Resilience to Biotic and Abiotic Stresses. *Int J Mol Sci* 22:7687. <https://doi.org/10.3390/ijms22147687>
- Abdellatef E, Will T, Koch A et al. (2015) Silencing the expression of the salivary sheath protein causes transgenerational feeding suppression in the aphid *Sitobion avenae*. *Plant Biotechnol J* 13(6):849–857. <https://doi.org/10.1111/pbi.12322>
- Ahmed MMS, Bian S, Wang M et al (2017) RNAi-mediated resistance to *Rice black-streaked dwarf virus* in transgenic rice. *Transgen Res* 26(2):197–207. <https://doi.org/10.1007/s11248-016-9999-4>
- Akbar S, Tahir M, Wang MB, Liu Q (2017) Expression analysis of hairpin RNA carrying sugarcane mosaic virus (SCMV) derived sequences and transgenic resistance development in a model rice plant. *Biomed Res Int* 1646140. <https://doi.org/10.1155/2017/1646140>
- Akbar S, Wei Y, Zhang M.-Q. (2022) RNA Interference: Promising Approach to Combat Plant Viruses. *Int J Mol Sci* 23(10):5312. <https://doi.org/10.3390/ijms23105312>
- Ali N, Datta N, Datta K (2010) RNA interference in designing transgenic crops *GM Crops* 1:(4)207–213. <https://doi.org/10.4161/gmcr.1.4.13344>
- Ali N, Paul S, Gayen D, Sarkar SN and Datta K (2013a) Development of Low Phytate Rice by RNAi Mediated Seed-Specific Silencing of Inositol 1,3,4,5,6-Pentakisphosphate 2-Kinase Gene (IPK1). *PLoS ONE* 8(7):e68161. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068161>
- Ali N, Paul S, Gayen D et al (2013b) RNAi mediated down regulation of myo-inositol-3-phosphate synthase to generate low phytate rice. *Rice* 6:12. <https://doi.org/10.1186/1939-8433-6-12>
- Altenbach SB, Tanaka CK, Allen PV (2014a) Quantitative proteomic analysis of wheat grain proteins reveals differential effects of silencing of omega-5 gliadin genes in transgenic lines. *J Cereal Sci* 59:118–125. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.11.008>
- Altenbach SB, Tanaka CK, Seabourn BW (2014b) Silencing of omega-5 gliadins in transgenic wheat eliminates a major source of environmental variability and improves dough mixing properties of flour *BMC Plant Biol* 14:393. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0393-1>
- Ansari A, Wang C, Wang J et al (2017) Engineered Dwarf Male-Sterile Rice: A Promising Genetic Tool for Facilitating Recurrent Selection in Rice. *Front Plant Sci* 8:21–32. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02132>

- Bai X, Huang X, Tian S et al (2021) RNAi-mediated stable silencing of TaCSN5 confers broad-spectrum resistance to *Puccinia striiformis* f. Sp Tritici. *Mol Plant Pathol* 22:410–421. <https://doi.org/10.1111/mpp.13034>
- Barro F, Iehisa JC, Giménez MJ et al (2016) Targeting of prolamins by RNAi in bread wheat: effectiveness of seven silencing-fragment combinations for obtaining lines devoid of coeliac disease epitopes from highly immunogenic gliadins. *Plant Biotechnol J* 14:986–996. <https://doi.org/10.1111/pbi.12455>
- Baulcombe D (2019) How Virus Resistance Provided a Mechanistic Foundation for RNA Silencing. *The Plant Cell* 31:1395–1396. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00348>
- Baum JA, Bogaert T, Clinton W et al (2007) Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat Biotechnol* 25(11):1322–1326. <https://doi.org/10.1038/nbt1359>
- Baum JA, Roberts JK (2014) Progress Towards RNAi-Mediated Insect Pest Management. *Advan Insect Physiol* 47:250–295. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800197-4.00005-1>
- Bharathi J, Anandan R, Benjamin L, Muneer S, Prakash M (2023) Recent trends and advances of RNA interference (RNAi) to improve agricultural crops and enhance their resilience to biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol Biochem* Jan194:600–618. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.11.035>
- Bilir Ö, Göl D, Hong Y et al (2022) Small RNA-based plant protection against diseases. *Front Plant Sci* 13:951097. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.951097>
- Blyuss KB, Fatehi F, Tsygankova VA et al (2019) RNAi-Based Biocontrol of Wheat Nematodes Using Natural Poly-Component Biostimulants. *Front Plant Sci* 10:483. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00483>
- Bolognesi R, Ramaseshadri P, Anderson J et al (2012) Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn root-worm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) *PLoS ONE* 7:e47534. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047534>
- Canto-Pastor A, Santos BA, Valli AA et al (2019) Enhanced resistance to bacterial and oomycete pathogens by short tandem target mimic RNAs in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* 116(7):2755–2760. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814380116>
- Chen CL, Liu SS, Liu Q et al (2015) An ANNEXIN-like protein from the cereal cyst nematode *Heterodera avenae* suppresses plant defense. *PLoS ONE* 10:e0122256. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122256>
- Chen W, Kastner C, Nowara D et al (2016) Host-induced silencing of *Fusarium culmorum* genes protects wheat from infection. *J Exp Bot* Sep 67(17):4979–4991. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw263>
- Cheng W, Song XS, Li HP et al (2015) Host-induced gene silencing of an essential chitin synthase gene confers durable resistance to *Fusarium head blight* and seedling blight in wheat. *Plant Biotechnol J* 13(9):1335–1345. <https://doi.org/10.1111/pbi.12352>
- Cruz LF, Rupp JLS, Trick HN, Fellers JP (2014) Stable resistance to *Wheat streak mosaic virus* in wheat mediated by RNAi In Vitro. *Cell Dev Plant* 50(6):665–672. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9634-0>
- Dalakouras A, Wassenegger M, Dadami E et al (2020) Genetically Modified Organism-Free RNA Interference: Exogenous Application of RNA Molecules in Plants. *Plant Physiol* 182:38–50. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00570>
- Da Silva LS, Taylor J, Taylor JRN (2011) Transgenic sorghum with altered kafirin synthesis: kafirin solubility, polymerization and protein digestion. *J agric Food Chem* 59:9265–9270. <https://doi.org/10.1021/jf201878p>
- de Framond A, Rich PJ, McMillan J, Ejeta G (2007) Effects on Striga parasitism of transgenic maize armed with RNAi constructs targeting essential *S. asitica* genes. In: Integrating new technologies for Striga control: Towards ending the witch-hunt. Singapore: World Scientific Publishing Company Pte Ltd 185–196. https://doi.org/10.1142/9789812771506_0014
- Dubrovna OV, Stasik OO, Priadkina GO et al (2020) Resistance of genetically modified wheat plants, containing a double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene, to soil moisture deficiency. *Agric Sci Pract* 7(2):24–34. <https://doi.org/10.15407/agrisp7.02.024>
- Dubrovna OV, Priadkina GO, Mykhalska SI, Komisarlenko AG (2022) Drought-tolerance of transgenic winter wheat with partial suppression of the proline dehydrogenase gene. *Regulat Mechan Biosyst* 13(4):385–392. <https://doi.org/10.15421/022251>
- Dutta TK, Banakar P, Rao U (2015) The status of RNAi-based transgenic research in plant nematology. *Front Microbiol* 5:1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00760>
- Dutta TK, Papolu PR, Singh D et al (2020) Expression interference of a number of *Heterodera avenae* conserved genes perturbs nematode parasitic success in *Triticum aestivum*. *Plant Sci* 301:110670. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110670>
- El'konin LA, Domanina IV, Ital'yanskaya YuV (2016) Genetic engineering as a tool for modification of seed storage proteins and improvement of nutritional value of cereal grain. *Agric Biol* 51(1):17–30. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2016.1.17eng>
- Fahim M, Ayala-Navarrete L, Millar AA, Larkin PJ

- (2010) Hairpin RNA derived from viral NIa gene confers immunity to wheat streak mosaic virus infection in transgenic wheat plants. *Plant Biotechnol J* 8:821–834. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00513.x>
- Feldmann KA (2006) Steroid regulation improves crop yield. *Nat Biotechnol* 24:46–47. <https://doi.org/10.1038/nbt0106-46>
- Feng Z, Yuan M, Zou J et al (2021) Development of marker-free rice with stable and high resistance to rice black-streaked dwarf virus disease through RNA interference. *Plant Biotechnol J* 19:212–214. <https://doi.org/10.1111/pbi.13459>
- Fire AS, Xu MK, Montgomery SA et al (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669):806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Fletcher SJ, Reeves PT, Hoang BT, Mitter NA (2020) Perspective on RNAi-Based Biopesticides. *Front Plant Sci* 11:51. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00051>
- Frizzi A, Huang S, Gilbertson L et al (2008) Modifying lysine biosynthesis and catabolism in corn with a single bifunctional expression/silencing transgene cassette. *Plant Biotechnol J* 6(1):13–21. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00290.x>
- Gantasala NP, Kumar M, Banakar P, Thakur PK, Rao U (2015) Functional validation of genes in cereal cyst nematode, *Heterodera avenae*, using siRNA gene silencing. In *Nematodes of Small Grain Cereals: Current Status and Research*; Dababat A, Muminjanov H, Smiley RW, Eds FAO: Ankara Turkey 353–356.
- Gasparis S, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A (2013) Sina and Sinb genes in triticales do not determine grain hardness contrary to their orthologs Pina and Pinb in wheat. *Bmc Plant Biol* 13:190. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-190>
- Gasparis S, Orczyk W, Zalewski W, Nadolska-Orczyk A (2011) The RNA-mediated silencing of one of the *Pin* genes in allohexaploid wheat simultaneously decreases the expression of the other, and increases grain hardness. *J Exp Bot* 62:4025–4036. <https://doi.org/10.1093/jxb/err103>
- Gil-Humanes J, Piston F, Gimenez MJ., Martin A, Barro F (2012) The introgression of RNAi silencing of γ -gliadins into commercial lines of bread wheat changes the mixing and technological properties of the dough. *PLoS ONE* 7(9):e45937. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045937>
- Gil-Humanes J, Piston F, Hernando A et al (2008) Silencing of γ -gliadins by RNA interference (RNAi) in bread wheat. *J Cereal Sci* 48:565–568. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2008.03.005>
- Gil-Humanes J, Pistyn F, Tollefsen S, Sollid LM and Barro F (2010) Effective shutdown in the expression of celiac disease-related wheat gliadin T-cell epitopes by RNA interference. *PNAS USA* 107(39):17023–17028. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007773107>
- Ghag SB (2017) Host induced gene silencing, an emerging science to engineer crop resistance against harmful plant pathogens. *Physiol Mol Plant Pathol* 100 ISSN : 0885-5765
- Godwin ID, Williams SB, Pandit PS, Laidlaw HK (2009) Multifunctional grains for the future: genetic engineering for enhanced and novel cereal quality In *Vitro. Cell & Dev Biol Plant* 45(3):383–399. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9175-5>
- Grootboom AW, Mkhonza NL, Mbambo Z et al (2014) Co-suppression of synthesis of major α -kafirin subclass together with γ -kafirin-1 and γ -kafirin-2 required for substantially improved protein digestibility in transgenic sorghum. *Plant Cell Rep* 33:521–537. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1556-5>
- Guo J, Gao S, Lin Q, Wang H et al (2015) Transgenic Sugarcane Resistant to *Sorghum mosaic virus* Based on Coat Protein Gene Silencing by RNA Interference *BioMed Research International* Volume Article ID 861907:9. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/861907>
- Hada A, Kumari C, Phani V et al (2020) Host-Induced Silencing of FMR Famide-Like Peptide Genes, flp-1 and flp-12, in Rice Impairs Reproductive Fitness of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne graminicola*. *Front Plant Sci* 11:894. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00894>
- Halder K, Chaudhuri A, Abdin MZ, Datta A (2023) Tweaking the Small Non-Coding RNAs to Improve Desirable Traits in Plant. *Int J Mol Sci* 24:3143. <https://doi.org/10.3390/ijms24043143>
- Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999) A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science* 286(5441):950–952 <https://doi.org/10.1126/science.286.5441.950>
- He F, Zhang R, Zhao J et al (2019) Host Induced Silencing of *Fusarium graminearum* genes enhances the resistance of *Brachypodium distachyon* to *Fusarium* Head Blight. *Front Plant Sci* 10:1362. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01362>
- Hernández-Soto A, Chacyn-Cerdas R (2021) RNAi crop protection advances. *Int J Mol Sci* 22(22):12148. <https://doi.org/10.3390/ijms222212148>
- Houmar NM, Mainville JL, Bonin CP et al (2007) High-lysine corn generated by endosperm-specific suppression of lysine catabolism using RNAi. *Plant Biotechnol J* 5:605–614. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00265.x>
- Hu X, Richtman NM, Zhao JZ et al (2016) Discovery of midgut genes for the RNA interference control of corn rootworm. *Sci Rep* 6:30542. <https://doi.org/10.1038/srep30542>
- Hu Y, Wu Q, Peng Z et al (2017) Silencing of OsGRXS17 in rice improves drought stress tolerance by modulating

- ROS accumulation and stomatal closure. *Sci Rep* 7:1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16230-7>
- Huang S, Frizzi A, Florida CA et al (2006) High lysine and high tryptophan transgenic maize resulting from the reduction of both 19- and 22-kD α -zeins. *Plant Mol Biol* 61:525–535. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-0027-6>
- Huang S, Kruger DE, Frizzi A et al (2005) High-lysine corn produced by the combination of enhanced lysine biosynthesis and reduced zein accumulation. *Plant Biotechnol J* 3:555–569. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2005.00146.x>
- Jiang CJ, Shimono M, Maeda S et al (2009) Suppression of the rice fatty-acid desaturase gene OsSSI2 enhances resistance to blast and leaf blight diseases in rice. *Mol Plant-Microbe Interactions* 22(7):820–829. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-7-0820>
- Joga MR, Zotti MJ, Smaghe G et al (2016) RNAi Efficiency, Systemic Properties, and Novel Delivery Methods for Pest Insect Control: What We Know So Far. *Front Physiol* 7:553. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00553>
- Johnson ET, Proctor RH, Dunlap CA, Busman M (2018) Reducing production of fumonisin mycotoxins in *Fusarium verticillioides* by RNA interference. *Mycotoxin Res* 34:29. <https://doi.org/10.1007/s12550-017-0296-8>
- Kamthan A, Chaudhuri A, Kamthan M, Datta A (2015) Small RNAs in plants: Recent development and application for crop improvement. *Front Plant Sci* 6:208. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00208>
- Katoch R, Thakur N (2013) Advances in RNA interference technology and its impact on nutritional improvement, disease and insect control in plants. *Appl Biochem Biotechnol* 169(5):1579–1605. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-0046-5>
- Kaur R, Choudhury A, Chauhan S et al (2021) RNA interference and crop protection against biotic stresses. *Physiol Mol Biol Plants* 27(10):2357–2377. <https://doi.org/10.1007/s12298-021-01064-5>
- Kawakatsu T, Hirose S, Yasuda H, Takaiwa F (2010) Reducing rice seed storage protein accumulation leads to changes in nutrient quality and storage organelle formation. *Plant Physiol* 154:1842–1854. <https://doi.org/10.1104/pp.110.164343>
- Kim H-J, Lee J-Y, Yoon U-H, Lim SH and Kim Y-M (2013) Effects of reduced prolamin on seed storage protein composition and the nutritional quality of rice. *Int J Mol Sci* 14:17073–17084. <https://doi.org/10.3390/ijms140817073>
- Koch A, Kogel KH (2014) New wind in the sails: improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing. *Plant Biotechnol J* 12:821–831. <https://doi.org/10.1111/pbi.12226>
- Koch A, Kumar N, Weber L et al (2013) Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14-demethylase-encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(48):19324–19329. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306373110>
- Kong X, Yang M, Le BH et al (2022) The Master Role of SiRNAs in Plant Immunity. *Mol Plant Pathol* 23(10):1565–1574. <https://doi.org/10.1111/mpp.13250>
- Kumar K, Geetika C, Dass A et al (2020) Genetically modified crops: current status and future prospects. *Planta* 251(4):91. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03372-8>
- Kumar T, Dweikat I, Sato S et al (2012) Modulation of kernel storage proteins in grain sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Plant Biotechnol J* 10:533–544. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00685.x>
- Kusaba M, Miyahara K, Iida S et al (2003) Low glutenin content 1: a dominant mutation that suppresses the glutenin multigene family via RNA silencing in rice. *Plant Cell* 15:1455–1467. <https://doi.org/10.1105/tpc.011452>
- Kuwano M, Ohyama A, Tanaka Y et al (2006) Molecular breeding for transgenic rice with low-phytic-acid phenotype through manipulating myo-inositol 3-phosphate synthase gene. *Mol Breed* 18(3):263–272. <https://doi.org/10.1007/s11032-006-9038-x>
- Lacombe S, Bangratz M, Ta H et al (2021) Optimized RNA-Silencing Strategies for *Rice Ragged Stunt Virus* Resistance in Rice. *Plants (Basel)* 10(10):2008. Published online Sep 24. <https://doi.org/10.3390/plants10102008>
- Le D, Chu H, Sasaya T (2015) Creation of transgenic rice plants producing small interfering RNA of *Rice tungro spherical virus*. *GM Crops Food* 6(1):47–53. <https://doi.org/10.1080/21645698.2015.1025188>
- Li DH, Liu H, Yang YI, Zhen PP, Liang JS (2009) Down-regulated expression of RACK1 gene by RNA interference enhances drought tolerance in rice. *Rice Sci* 16:14–20. [https://doi.org/10.1016/S1672-6308\(08\)60051-7](https://doi.org/10.1016/S1672-6308(08)60051-7)
- Li JL, Chen XX, Shi CC et al (2020) Effects of OsRPK1 gene overexpression and RNAi on the salt-tolerance at seedling stage in rice. *Acta Agron Sin* 46:1217–1224. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1006.2020.92060>
- Li Z, Liu Y, Berger PH (2005) Transgenic silencing in wheat transformed with the WSMV-CP gene. *Biotechnology* 4:62–68. <https://doi.org/10.3923/biotech.2005.62.68>
- Lilley CJ, Bakhtia M, Charlton WL, Urwin PE (2007) Recent progress in the development of RNA interference for plant parasitic nematodes. *Mol Plant Pathol* 8:701–711. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00422.x>

- Liu S, Geng S, Li A, Mao Y, Mao L (2021) RNAi technology for plant protection and its application in wheat. *aBIOTECH* 2:365–374. <https://doi.org/10.1007/s42994-021-00036-3>
- Liu F, Yang B, Zhang A, Ding D, Wang G (2019) Plant-mediated RNAi for controlling *Apoligus lucorum*. *Front Plant Sci* 10:64. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00064>
- Long X, Liu Q, Chan M et al (2012) Metabolic engineering and profiling of rice with increased lysine. *Plant Biotechnol J* 11(4):490–501. <https://doi.org/10.1111/pbi.12037>
- Ma J, Song Y, Wu B et al (2011). Production of transgenic rice new germplasm with strong resistance against two isolations of Rice stripe virus by RNA interference. *Transgenic Res* 20:1367–1377. <https://doi.org/10.1007/s11248-011-9502-1>
- Machado AK, Brown NA, Urban M et al (2018) RNAi as an emerging approach to control *Fusarium* head blight disease and mycotoxin contamination in cereals. *Pest Manag Sci* 74:790–799. <https://doi.org/10.1002/ps.4748>
- Masanga JO, Matheka JM, Omer RA (2015) Down-regulation of transcription factor aflR in *Aspergillus flavus* confers reduction to aflatoxin accumulation in transgenic maize with alteration of host plant architecture. *Plant Cell Rep* 34:1379–1387. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1794-9>
- Mezzetti B, Smaghe G, Arpaia S et al (2020) RNAi: What is its position in agriculture? *J Pest Sci* 93(4):1125–1130. <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01238-2>
- Mykhalska SI, Sergeeva LE, Matveeva AYu et al (2014) The elevation of free proline content in osmotolerant transgenic corn plants with dsRNA suppressor of proline dehydrogenase gene. *Plant Physiol Genet* 46(6):482–489 <http://dSPACE.nbuv.gov.ua/handle/123456789/159462>
- Nowara D, Gay A, Lacomme C et al (2010) HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *Plant Cell* 22:3130–3141. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.077040>
- Panwar V, Jordan M, McCallum B, Bakkeren G (2018) Host-induced silencing of essential genes in *Puccinia triticina* through transgenic expression of RNAi sequences reduces severity of leaf rust infection in wheat. *Plant Biotechnol J* 16:1013–1023. <https://doi.org/10.1111/pbi.12845>
- Panwar V, McCallum B, Bakkeren G (2013) Host-induced gene silencing of wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* pathogenicity genes mediated by the *Barley stripe mosaic virus* *Plant Mol Biol* 81:595–608. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0022-7>
- Panwar V, McCallum B, Bakkeren G (2013) Endogenous silencing of *Puccinia triticina* pathogenicity genes through in planta-expressed sequences leads to the suppression of rust diseases on wheat *Plant J* 73(3):521–532. <https://doi.org/10.1111/tpj.12047>
- Pistón F, Gil-Humanes J, Rodríguez-Quijano M, Barro F (2011) Down-regulating γ -gliadins in bread wheat leads to non-specific increases in other gluten proteins and has no major effect on dough gluten strength. *PLoS One* 6:e24754. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024754>
- Qi T, Guo J, Peng H et al (2019b) Host-induced gene silencing: a powerful strategy to control diseases of wheat and barley. *Int J Mol Sci* 20:206. <https://doi.org/10.3390/ijms20010206>
- Qi T, Guo J, Liu P et al (2019) Stripe Rust Effector PstGSRE1 Disrupts Nuclear Localization of ROS-Promoting Transcription Factor TaLOL2 to Defeat ROS-Induced Defense in Wheat. *Mol Plant* 12:1624–1638. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.09.010>
- Qi T, Zhu X, Tan C et al (2018) Host-induced gene silencing of an important pathogenicity factor PsCPK1 in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* enhances resistance of wheat to stripe rust. *Plant Biotechnol J* 16:797–807. <https://doi.org/10.1111/pbi.12829>
- Qiao F, Yang Q, Wang CL et al (2007) Modification of plant height via RNAi suppression of OsGA20ox2 gene in rice. *Euphytica* 158:35–45. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9422-6>
- Rajam MV (2020) RNA silencing technology: A boon for crop improvement *J Biosci* 45:118. PMID: 33051412
- Raruang Y, Omolehin O, Hu D et al (2020) Host Induced Gene Silencing Targeting *Aspergillus flavus* aflM Reduced Aflatoxin Contamination in Transgenic Maize Under Field Conditions. *Front Microbiol* 11:754. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00754>
- Regina A, Bird A, Topping D et al (2006) High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(10):3546–51. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510737103>
- Riechen J (2007) Establishment of broad-spectrum resistance against *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* in *Triticum aestivum* by RNAi-mediated knock-down of MLO *J Verbr Lebensm* 2 (Suppl 1) 120. <https://doi.org/10.1007/s00003-007-0282-8>
- Rodrigues TB, Petrick JS (2020) Safety considerations for humans and other vertebrates regarding agricultural uses of externally applied RNA molecules. *Front Plant Sci* 11:407. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00407>
- Sang H, Kim J (2020) Advanced strategies to control plant pathogenic fungi by host-induced gene silencing (HIGS) and spray-induced gene silencing (SIGS). *Plant Biotechnol Rep* 14:1. <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00588-3>

- Sasaya T, Nakazono-Nagaoka E, Saika H et al (2014) Transgenic strategies to confer resistance against viruses in rice plants. *Front Microbiol* 4:409. <https://doi.org/0.3389/fmicb.2013.00409>
- Schaefer KL, Parlange F, Buchmann G et al (2020) Cross-Kingdom RNAi of Pathogen Effectors Leads to Quantitative Adult Plant Resistance in Wheat. *Front Plant Sci* 11:253. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00253>
- Segal G, Song R, Messing J (2003) A new opaque variant of maize by a single dominant RNA-interference-inducing transgene. *Genetics* 165:387–397. <http://www.genetics.org/content/165/1/387.full.pdf>
- Sharma S, Kumar G, Dasgupta I (2018) Simultaneous resistance against the two viruses causing rice tungro disease using RNA interference. *Virus Res* 255:157–164. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.07.011>
- Shepherd DN, Mangwende T, Martin DP et al (2007) Inhibition of maize streak virus (MSV) replication by transient and transgenic expression of MSV replication-associated protein mutants. *J Gen Virol* 88:325–336. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82338-0>
- Shimizu T, Nakazono-Nagaoka E, Uehara-Ichiki T et al (2011) Targeting specific genes for RNA interference is crucial to the development of strong resistance to *Rice stripe virus* Plant *Biotechnol J* 9(4):503–512. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00571.x>
- Shimizu T, Ogamino T, Hiraguri A et al (2013) Strong resistance against Rice grassy stunt virus is induced in transgenic rice plants expressing double-stranded RNA of the viral genes for nucleocapsid or movement proteins as targets for RNA interference. *Phytopathology* 103(5):513–519. <https://doi.org/10.1094/PHTO-07-12-0165-R>
- Shimizu T, Yoshii M, Wei T et al (2009) Silencing by RNAi of the gene for Pns12, a viroplasm matrix protein of Rice dwarf virus, results in strong resistance of transgenic rice plants to the virus. *Plant Biotechnol J* 7(1):24–32. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00366.x>
- Shimizu T, Nakazono-Nagaoka E, Akita F et al (2012) Hairpin RNA derived from the gene for Pns9, a viroplasm matrix protein of Rice gall dwarf virus, confers strong resistance to virus infection in transgenic rice plants. *J Biotechnol* 157(3):421–427. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.12.015>
- Shoup Rupp JL, Cruz LF, Trick HN, Fellers JP (2016) RNAi-mediated, stable resistance to *Triticum mosaic virus* in wheat *Crop Sci* 56:1602–1610. <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.09.0577>
- Singh K, Dardick Ch, Kindu JK (2019) RNAi-mediated resistance against viruses in perennial fruit plants. *Plants* 8:359. <https://doi.org/10.3390/plants8100359>
- Sivamani E, Brey CW, Dyer WE et al (2000) Resistance to wheat streak mosaic virus in transgenic wheat expressing the viral replicase (NIb) gene. *Mol Breed* 6:469–477. <https://doi.org/10.1023/A:1026576124482>
- Sivamani E, Brey CW, Talbert LE et al (2002) Resistance to wheat streak mosaic virus in transgenic wheat engineered with the viral coat protein gene. *Transgen Res* 11(1):31–41. <https://doi.org/10.1023/a:1013944011049>
- Sun Y, Sparks C, Jones H et al (2019) Silencing an essential gene involved in infestation and digestion in grain aphid through plant-mediated RNA interference generates aphid-resistant wheat plants. *Plant Biotechnol J* 17:852–854. <https://doi.org/10.1111/pbi.13067>
- Thakare D, Zhang J, Wing R, Cotty P, Schmidt M (2017) Aflatoxin-free transgenic maize using host-induced gene silencing. *Sci Adv* 3:e1602382. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1602382>
- Tiwari IM, Jesuraj A, Kamboj R et al (2017) Host Delivered RNAi, an efficient approach to increase rice resistance to sheath blight pathogen (*Rhizoctonia solani*). *Sci Rep* 7:7521. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07749-w>
- Tsygankova VA, Blyuss KB, Shysha EN et al (2020) Using Microbial Biostimulants to Deliver RNA Interference in Plants as an Effective Tool for Biocontrol of Pathogenic Fungi, Parasitic Nematodes and Insects. Chapter 6. P. 205-319. In: «Research Advances in Plant biotechnology». Series: Plant Science Research and Practices / Ed. Ya.B. Blume USA: Nova Science Publishers, Inc., 270 p. ISBN: 978-1-53616-432-9
- Tyagi H, Rajasubramaniam RMV, Dasgupta I (2008) RNA-interference in rice against Rice tungro bacilliform virus results in its decreased accumulation in inoculated rice plants. *Transgen Res* 17(5):897–904. <https://doi.org/10.1007/s11248-008-9174-7>
- Va'rallyay E', Giczey G, Burgyarn J (2012) Virus-induced gene silencing of Mlo genes induces powdery mildew resistance in *Triticum aestivum*. *Arch Virol* 157:1345–1350. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1286-y>
- Verma V, Sharma S, Devi SV, Rajasubramaniam S, Dasgupta I (2012) Delay in virus accumulation and low virus transmission from transgenic rice plants expressing Rice tungro spherical virus RNA. *Virus Genes* 45:350–9. <http://dx.doi.org/10.1007/s11262-012-0787-9>
- Wang F, Li W, Zhu J et al (2016a) Hairpin RNA targeting multiple viral genes confers strong resistance to rice black-streaked dwarf virus. *Int J Mol Sci* 17(5):705. <https://doi.org/10.3390/ijms17050705>
- Wang M, Wu L, Mei Y et al (2020) Host-induced gene silencing of multiple genes of *Fusarium graminearum* enhances resistance to Fusarium head blight in wheat.

- Plant Biotechnol J 18(12):2373–2375. <https://doi.org/10.1111/pbi.13401>
- Wang Y, Cheng X, Shan Q et al (2014) Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol* 32:947–951. <https://doi.org/10.1038/nbt.2969>
- Wang MB, Abbott DC, Waterhouse PM (2000) A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus. *Mol Plant Pathol* 1(6):347–356. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2000.00038.x>
- Wen S, Wen N, Pang J et al (2012) Structural genes of wheat and barley 5-methylcytosine DNA glycosylases and their potential applications for human health. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:20543–20548. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217927109>
- Weise SE, Aung K, Jarou ZJ et al (2012) Engineering starch accumulation by manipulation of phosphate metabolism of starch. *Plant Biotechnol J* 10:545–554. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00684.x>
- Wieser H, Koehler P, Folck A, Becker D (2006) Characterization of wheat with strongly reduced α -gliadin content 9th Annual Gluten Workshop 14–16 September San Francisco California. USA Lookhart GL, PKW Ng (eds) AACC Paul St, MN 2006:13–16
- Xu L, Duan X, Lv Y et al (2014) Silencing of an aphid carboxylesterase gene by use of plant-mediated RNAi impairs *Sitobion avenae* tolerance of Phoxim insecticides. *Transgen Res* 23(2):389–396. <https://doi.org/10.1007/s11248-013-9765-9>
- Xu L, Hou Q, Zhao Y et al (2017) Silencing of alipase maturation factor 2-like gene by wheat-mediated RNAi reduces the survivability and reproductive capacity of the grain aphid *Sitobion avenae*. *Arch Insect Biochem Physiol* 95(3). <https://doi.org/10.1002/arch.21392>
- Yang B, Sugio A, White FF (2006) Os8N3 is a host disease susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:10503–10508. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604088103>
- Yara A, Yaeno T, Hasegawa M et al (2007) Disease resistance against *Magnaporthe grisea* is enhanced in transgenic rice with suppression of ω -3 fatty acid desaturases. *Plant Cell Physiol* 48:1263–1274. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm107>
- Younis A, Siddique MI, Kim C-K, Lim K-B (2014) RNA Interference (RNAi) induced gene silencing: a promising approach of hi-tech plant breeding. *Int J Biol Sci* 10(10):1150–1158. <https://doi.org/10.7150/ijbs.10452>
- Yu H, Wang Y, Fu F, Li W (2022) Transgenic Improvement for Biotic Resistance of Crops. *Int J Mol Sci* 23:14370. <https://doi.org/10.3390/ijms232214370>
- Yu R, Xu X, Liang Y et al (2014) The insect ecdysone receptor is a good potential target for RNAi based pest control. *Int J Biol Sci* 10(10):1171–1180. <https://doi.org/10.7150/ijbs.9598>
- Zha W, Peng X, Chen R et al (2011) Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-mediated RNA interference in the hemipteran insect *Nilaparvata lugens*. *PLoS One* 6:e20504. <https://doi.org/10.1371/journal.p020504>
- Zhang J, Khan SA, Heckel DG, Bock R (2017) Next-generation insect-resistant plants: RNAi-mediated crop protection. *Trends Biotechnol* 35:871–882. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.04.009>
- Zhang ZY, Fu FL, Gou L et al (2010) RNA Interference-Based Transgenic maize resistant to maize dwarf mosaic virus. *J Plant Biol* 53:297–305. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.03.019>
- Zhang ZY, Yang L, Zhou SF et al (2011) Improvement of resistance to maize dwarf mosaic virus mediated by transgenic RNA interference. *J Biotechnol* 153:181–187. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.03.019>
- Zhang ZY, Wang YG, Shen XJ et al (2013) RNA interference-mediated resistance to maize dwarf mosaic virus. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 113:571–578. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0289-z>
- Zhao Y et al (2018) Plant-mediated RNAi of grain aphid CHS1 gene confers common wheat resistance against aphids. *Pest Manag Sci* 74:2754–2760. <https://doi.org/10.1002/ps.5062>
- Zhou B, Bailey A, Niblett CL, Qu R (2016) Control of brown patch (*Rhizoctonia solani*) in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) by host induced gene silencing. *Plant Cell Rep* 35:791–802. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1921-7>
- Zhou Y, Yuan Y, Yuan F et al (2012) RNAi-directed down-regulation of RSV results in increased resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Biotechnol Lett* 34:965–978. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0848-0>
- Zhu L, Zhu J, Liu Z et al (2017) Host-Induced Gene Silencing of Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae* Pathogenicity Genes Mediated by the Brome Mosaic Virus. *Genes* 8:241. <https://doi.org/10.3390/genes8100241>
- Zhu X, Qi T, Yang Q et al (2017) Host-induced gene silencing of the MAPKK gene *PsFUZ7* confers stable resistance to wheat stripe rust. *Plant Physiol* 175:1853–1863. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01223>

Надійшла в редакцію 31.05.23
Після доопрацювання 15.06.23
Прийнята до друку 18.11.23