

УДК 577.21:581.5:576.858.8

РОЛЬ КОРОТКИХ РНК В УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К БИОТИЧЕСКИМ И АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ

© 2013 г. В.И. Малиновский¹, Г.Б. Боровский², Е.Л. Горбылева^{2,3},
И.В. Федосеева^{2,3}, Е.Л. Таусон², В.А. Соколов⁴, В.К. Войников²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток, Россия,
e-mail: ibss@eastnet.febras.ru;

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт
физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск,
Россия, e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru, dzubina@sifibr.irk.ru,
fedoseeva@sifibr.irk.ru, tauson@sifibr.irk.ru, vvk@sifibr.irk.ru;

³ Национальный исследовательский Иркутский государственный технический университет,
Иркутск, Россия;

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной
и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, Россия, e-mail: sokolov@mcb.nsc.ru

Поступила в редакцию 20 сентября 2012 г. Принята к публикации 18 октября 2012 г.

Малые некодирующие РНК являются отдельным классом РНК, регулирующим множество физиологических процессов в растениях. В статье приведены литературные данные об образовании коротких РНК (siРНК и miРНК), обсуждается их роль в защите растений от биотических и абиотических стрессов, а также кратко рассматриваются методические приемы, позволяющие использовать данный класс РНК в качестве агентов для управления устойчивостью растений.

Ключевые слова: РНК-интерференция, miРНК, siРНК, вирусы растений, вирусные супрессоры, биотический стресс.

Одним из защитных механизмов растений является у молчание генов (RNA silencing или RNA interference) – регуляция экспрессии генов на основе специфического узнавания и деградации РНК. Эпигенетический сайленсинг – это форма репрессии генетической активности, которая устанавливается в строго определенное время онтогенеза и затем наследуется во многих клеточных поколениях (Жимулев и др., 2004). В опытах с трансгенными растениями, в геном которых встраивали вирусные гены, вирусостойчивость коррелировала с разрушением трансгенной мРНК в цитоплазме (Lindbo *et al.*, 1993), сопровождалась накоплением коротких (примерно 25 нуклеотидов) двухцепочечных РНК (dsРНК) (Hamilton, Baulcombe, 1999) и была сиквенс-специфичной (English *et al.*, 1996). Сиквенс-специфичная устойчивость, или пост-

транскрипционное у молчание генов (post-transcriptional gene silencing, PTGS), проявлялась у трансгенных растений не только к первоначально использованному вирусу, но и к другим вирусам, имеющим гомологичные последовательности (Ratcliff *et al.*, 1999). В течение последнего десятилетия установлено, что короткие РНК (sRNA) играют ключевую роль в регуляции активности значительной доли транскриптома растений при абиотическом и биотическом стрессе (см. обзоры Guleria *et al.*, 2011; Contreras-Cubas *et al.*, 2012; Khraiwesh *et al.*, 2012). Список воздействий, запускающих регуляторный ответ организма через sRNA, включает в себя реакцию на патогены, освещение, водный стресс, минеральное питание, солевой стресс, гипоксию, механический стресс и изменения температуры (Guleria *et al.*, 2011). Примечательно, что

активность системы образования sRNA также контролируется через sRNA (Vaucheret *et al.*, 2004). Таким образом, в растении функционирует регуляторная сеть стресс-чувствительных sRNA, перестраивающая метаболизм клетки при стрессе (Khraiwesh *et al.*, 2012).

Согласно современным представлениям (Дорохов, 2007), известно три механизма у молкания генов у растений: цитоплазматическое у молкание трансгенных и вирусных РНК, у молкание эндогенных мРНК, транскрипционное у молкание генов.

ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЕ УМОЛКАНИЕ РНК

Синтезированная трансгеном одноцепочечная (ss) мРНК превращается в dsРНК при участии фермента растения-хозяина РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp). При заражении растений РНК-содержащими вирусами в клетках синтезируется вирусная RdRp, которая образует вирусную репликативную dsРНК. Эти dsРНК включают механизм сиквенс-специфичной деградации РНК, индуцируя повышение активности специфической РНКазы III, гидролизующей dsРНК. Этот фермент впервые был выявлен в клетках *Drosophila melanogaster* и получил название Dicer (Bernstein *et al.*, 2001). У растений аналогичный фермент назвали Dicer-like (DCL).

У *Arabidopsis thaliana* L. DCL1 участвует в образовании микроРНК (miРНК), DCL2 – коротких интерферирующих РНК (siРНК), DCL3 ответственен за модификацию хроматина, DCL4 – трансдействующих siРНК. MiРНК – dsРНК длиной 21–25 нуклеотидов с двумя некомплементарными 3'-нуклеотидами образуются при нарезании клеточных шпилечных РНК. SiРНК – dsРНК длиной 21–25 нуклеотидов с двумя некомплементарными 3'-нуклеотидами и монофосфатом на 5'-конце образуются при нарезании длинных трансгенных и вирусных dsРНК. Трансдействующие siРНК подобно miРНК комплементарно взаимодействуют с мРНК другого локуса.

Ферменты DCL являются мультикомпонентными белками и содержат один или более доменов, связывающих dsРНК, сигнал ядерной локализации, двухдоменную хеликазу, двухдоменную

РНКазу III, а также PIWI, Argonaute (Ago), Zwillе (PAZ) домен, обеспечивающий специфическое взаимодействие с двумя неспаренными 3'-нуклеотидами. Кроме того, все известные ферменты DCL содержат домен Duf283 с неизвестной функцией. В результате взаимодействия dsРНК с DCL2 каждая цепь dsРНК разрезается в двух местах, отстоящих друг от друга на 2 нуклеотида, с образованием siРНК.

На следующем этапе siРНК расплетаются АТФ-зависимой хеликазой и одна цепь (guide strand) включается в так называемый комплекс RISC (RNA-induced silencing complex), где комплементарно связывается с вирусной РНК-мишенью. Белок Ago, основной компонент RISC, разрезает РНК-мишень в участке комплементарного взаимодействия с siРНК. Белки Ago выявлены в составе RISC у всех изученных организмов.

УМОЛКАНИЕ ЭНДОГЕННЫХ мРНК, ВЫЗВАННОЕ miРНК

Этот механизм регуляции экспрессии генома растений осуществляется с помощью miРНК. У растений miРНК образуются в три этапа при участии DCL1. Сначала синтезированная РНК-полимеразой II pri-miРНК превращается в pre-miРНК, которая преобразуется в более короткий предшественник. Затем формируется зрелая miРНК (Kurihara, Watanabe, 2004). У *Arabidopsis thaliana* идентифицирован белок HASTY, необходимый для переноса зрелых miРНК или комплекса miРНК-DCL1 из ядра в цитоплазму (Bollman *et al.*, 2003). На всех этапах созревания miРНК участвует dsРНК-связывающий белок HYL1, способный входить в комплекс с DCL1 и Ago (Kurihara *et al.*, 2006). Затем miРНК, подобно siРНК, взаимодействует с RISC, где комплементарно связывается с эндогенными мРНК, и белок Ago разрезает РНК-мишень. Количество идентифицированных растительных мРНК, у которых есть специфические miРНК-партнеры, постоянно увеличивается.

Так, например, было показано, что в регуляции устойчивости растений к патогенам участвует группа miРНК, где главную роль играют miR482 и miR2118. Все члены этой группы различаются между собой в последовательности нуклеотидов и по содержанию в различных

видах растений, но все они влияют на нуклеотид-связывающий сайт (NBS) и лейцин-богатые повторы (LRR) мРНК. Это приводит к разрушению мРНК и продукции вторичных siРНК при участии RdRp6 (Shivaprasad *et al.*, 2012).

Jones-Rhoads и Bartel в 2004 г. обнаружили новые miРНК, мишенями которых являются гены, кодирующие супероксиддисмутазы, лакказы и АТФ-сульфуриказы (APS). Показано, что экспрессия специфической miR395 увеличивалась при сульфатном голодании. РНК-мишенями miR395 являются гены, кодирующие АТФ-сульфуриказы *Aps1*, *Aps3* и *Aps4*, белки, участвующие в первой стадии накопления неорганического сульфата. R. Sunkar и J. Zhu (2004) обнаружили несколько новых miРНК (*miR393*, *miR397b*, *miR402*, *miR319c*, *miR389a*) в проростках *Arabidopsis thaliana* после обработки различными абиотическими стрессами: обработка холодом, абсцизовой кислотой, подсушивание, гиперосмотический стресс. В пшенице было обнаружено различное накопление малых РНК в ответ на тепловой стресс. Например, образование *miR172* значительно снижалось, тогда как содержание *miR156*, *miR159*, *miR160*, *miR166*, *miR168*, *miR169*, *miR393* и *miR827* увеличивалось в условиях повышенной температуры.

ТРАНСКРИПЦИОННОЕ УМОЛКАНИЕ ГЕНОВ

Впервые этот механизм был выявлен у трансгенных растений табака со встроенной последовательностью кДНК вириода веретеновидности клубней картофеля, которая метилировалась после заражения вириодом. M. Wassenecker с соавт. (1994) пришли к заключению, что реплицирующаяся вириодная РНК вызывает специфичное метилирование гомологичных последовательностей в растительном геноме. Этот феномен получил название РНК-зависимое метилирование ДНК. Позже было показано (Mette *et al.*, 2000), что экспрессия dsРНК промоторных последовательностей включает сиквенс-специфичное метилирование этих промоторов с последующим транскрипционным умолканием. Этот процесс осуществляется при участии специфических siРНК и модифицированного гистона (Zilberman *et al.*, 2003). В РНК-зависимом метилировании ДНК *de novo*

участвуют ДНК метилтрансферазы 1 и 2, а гистондиацетилаза 6 усиливает их активность, что приводит к изменению гетерохроматина в участке локуса-мишени (Matzke *et al.*, 2004).

В то же время 2'-О-метилирование 3' терминальной рибозы коротких РНК при участии метилтрансферазы HUA ENHANCER1 повышало их стабильность. Стабильность коротких РНК также увеличивалась РНК-связывающими белками и при образовании комплементарных РНК и *cis*-элементов в последовательности нуклеотидов коротких РНК (Ji, Chen, 2012).

Дальнейшее исследование механизмов РНК-интерференции у трансгенных растений выявило существование множества путей биогенеза miРНК и регуляции экспрессии генов. В зависимости от последовательности ДНК (малокопийные гены, транспозонные элементы, прямые и инвертированные повторы, повторы генов рРНК и др.) могут быть задействованы различные механизмы транскрипционной репрессии и отчасти эти механизмы могут перекрываться друг с другом. Показано, что РНК-зависимое метилирование ДНК в растениях играет важную роль во многих процессах, таких, как инактивация транспозонов и повторов в геноме, регуляция экспрессии эндогенных генов в ходе развития растений и в ответ на стрессовые воздействия (Маренкова, Дейнеко, 2010).

РАСПРОСТРАНЕНИЕ УМОЛКАНИЯ ГЕНОВ ПО РАСТЕНИЮ

Во многих работах показано, что умолкание генов, возникнув в какой-нибудь клетке, распространяется по растению, вызывая системное умолкание гена-мишени (Voinnet, Baulcombe, 1997; Fagard, Vaucheret, 2000; Mlotshwa *et al.*, 2002; Ryabov *et al.*, 2004; Tournier *et al.*, 2006). Сигнал умолкания перемещался от клетки к клетке по плазмодесмам (ближний транспорт) на расстояние 10–15 клеток от места индукции и по флоэме в другие органы (дальний транспорт). Возможно, эти два вида транспорта имеют различные механизмы, так как они неодинаково ингибировались солями кадмия, вирусными белками и генными мутациями (Ueki, Citovsky, 2001; Humber *et al.*, 2003; Schwach *et al.*, 2005). Так как в процессе транспорта сигнал умолкания генов может сильно разбавляться, то

необходима его амплификация в клетках-реципиентах. Она осуществляется при участии RdRp и хеликазы (Himber *et al.*, 2003; Schwach *et al.*, 2005). Сигнал умолкания генов транспортируется как вверх, так и вниз по растению, но вверх более активно (Sonoda, Nishiguchi, 2000).

Природа сигнала умолкания генов пока неясна. Показано, что распространение умолкания всегда строго сиквенс-специфично, что может служить свидетельством того, что сигнал является или dsРНК или siРНК (Himber *et al.*, 2003; Mallory *et al.*, 2003; Melnyk *et al.*, 2011). Во флоэмном соке растений были обнаружены как короткие (Yoo *et al.*, 2004), так и более длинные молекулы РНК (Haywood *et al.*, 2005). В соке также был найден низкомолекулярный белок, способный связывать 25-нуклеотидные ssРНК. Было показано, что он может содействовать ближнему транспорту этих РНК, но не dsРНК (Yoo *et al.*, 2004).

ВИРУСНЫЕ СУПРЕССОРЫ УМОЛКАНИЯ ГЕНОВ

Несмотря на наличие у растений эффективного защитного механизма, основанного на сиквенс-специфичном узнавании и деградации вирусных РНК, многие вирусы поражают растения. В ходе эволюции вирусы приобрели способность преодолевать клеточную защиту. Как указывал Ю.Л. Дорохов (2007), два способа – быстрая сборка вирионов и компартментализация – были известны задолго до открытия умолкания генов. Сборка вирионов и компартментализация являются эффективной защитой вирусного генома от воздействий. Кроме того, вирусы содержат гены, кодирующие супрессоры умолкания генов. Первым известным и одним из наиболее изученных супрессоров является специфичная протеиназа (**helper component-proteinase**, HC-Pro), кодируемая потивирусами. Так, было показано, что в трансгенных растениях табака, экспрессирующих встроенный ген *hs-pro*, увеличивалось накопление вирусов (Shams-Bakhsh *et al.*, 2007). Такой эффект был обусловлен тем, что HC-Pro подавляет умолкание генов (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Kasschau, Carrington, 2001). В настоящее время супрессоры идентифицированы примерно у 30 вирусов растений и животных (Omarov, Scholthof, 2012). Вирусные супрессоры

ингибируют накопление коротких РНК, а также некоторые из них способны связываться с siРНК и miРНК (Дорохов, 2007). Опыты с вирусными супрессорами показали наличие в растительных клетках двух пулов белков Ago1, которые специфично взаимодействуют с miРНК и siРНК (Schott *et al.*, 2012). Также было установлено, что мутанты X-вируса картофеля, не способные подавлять умолкание генов, не могли транспортироваться от клетки к клетке (Bayne *et al.*, 2005). Вирусные супрессоры влияли на развитие растений и формирование симптомов заболевания (Shen *et al.*, 2012). Однако было показано, что в растениях табака кальмодулин-подобный белок (rgs-CaM) связывается с вирусными супрессорами и тем самым нейтрализует их действие (Nakahara *et al.*, 2012).

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

Интерферирующие РНК могут репрессировать экспрессию гена-мишени двумя различными путями: через расщепление mРНК и через транскрипционную инактивацию. В растениях оба процесса могут быть запущены путем трансформации соответствующих последовательностей в специализированных векторах для РНК-интерференции. Классические векторы этого типа сконструированы таким образом, что после транскрипции клонированных в них последовательностей в растительной клетке образуются протяженные dsРНК. Эти dsРНК далее взаимодействуют с ферментами DCL3 и DCL4, которые превращают dsРНК в siРНК. Образующиеся siРНК могут направлять прямое метилирование цитозина в гомологичном участке соответствующего геномного локуса либо, будучи инкорпорированными в Ago1, могут вызывать расщепление гомологичных mРНК (Hirai, Kodama, 2008).

Распространенными являются технологии умолкания генов растений с использованием конструкций, представляющих собой часть целевого гена в смысловой и антисмысловой ориентации, разделенных спейсером. Транскрипция такой конструкции приводит к образованию шпилечной структуры, где роль «стебля» выполняют фрагменты гена, комплементарно

соединяясь друг с другом, а спейсер образует петлю (RNA Interference ..., 2009).

Для у молкания генов часто применяется конститутивная трансформация, при этом конструкции клонируются в стандартных экспрессирующих бинарных векторах. В качестве примера для клонирования длинных шпилечных конструкций приведем векторы, позволяющие собрать эти структуры с помощью Gateway-клонирования, например pHELLSGATE (Helliwell, Waterhouse, 2003) и pANDA (Miki *et al.*, 2004). Gateway-клонирование основано на том, что ВР-клоназа переносит ПЦР-продукт целевого гена, фланкированный двумя attB сайтами, в донорный вектор (pDONR), несущий два attP сайта. После рекомбинации attB и attP сайтов фрагмент ДНК встраивается в структуру донорного вектора и фланкирован attL сайтами (attL1-ДНК-attL2). LR-клонажной реакцией он переносится в вектор, несущий две независимые Gateway кассеты, разделенные интронным спейсером (attR1-ccdB2-attR2-интрон-attR2-ccdB-attR1). Кассеты Gateway идентичны, за исключением того, что их рекомбинационные сайты attR1 и attR2 инвертированы относительно друг друга и две копии клонированной последовательности расположены «голова к голове» в результирующем экспрессирующем векторе (Karimi *et al.*, 2007). Был разработан целый ряд векторов на основе pHELLSGATE (Craft *et al.*, 2005; Wielopolska *et al.*, 2005). Преимуществом Gateway-клонирования является возможность переносить между векторами фрагменты ДНК, соблюдая их ориентацию и рамку считывания, а также избежать необходимости рестрикции и лигирования (Earley *et al.*, 2006).

Для стандартного клонирования были созданы векторы pHANNIBAL (Wesley *et al.*, 2001), pKANNIBAL (Helliwell, Waterhouse, 2005), pSAT (Yelin *et al.*, 2007), pSH (Hirai *et al.*, 2007). В этих векторах используются ПЦР-фрагменты целевого гена, полученные с помощью праймеров, содержащих рестрикционные сайты, и клонированные справа и слева от спейсера, для образования впоследствии «стебля» шпилечной структуры.

В литературе также описано тканеспецифичное у молкание генов, при котором экспрессия происходила под контролем промоторов (ARETALA1 или LFY), активных в лепестках

и чашелистиках (Schwab *et al.*, 2006; RNA Interference ..., 2009).

Альтернативой конститутивной трансформации является транзиентная, или временная, трансформация. Это необходимо, когда у молкание целевого гена является летальным или имеет большой плейотропный эффект (An *et al.*, 2003). К таким методам можно отнести использование плазмидных (Johansen *et al.*, 2001) и вирусных векторов (An *et al.*, 2003; RNA Interference ..., 2009). Существуют также векторы с индуцибельными промоторами. Так, были описаны конструкции, экспрессия которых индуцировалась спиртом, повышенной температурой (Chen *et al.*, 2003; Masclaux *et al.*, 2004). Дизайн векторов для у молкания генов растений подробно рассмотрен в обзоре S. Hirai и H. Kodama (2008).

К технологиям транзиентного у молкания генов также относятся такие методы, как обстрел, электропорация или ПЭГ-опосредованная трансформация протопластов или семян частицами с вектором (или только вектором), содержащим шпилечную конструкцию (An *et al.*, 2003; Zentella *et al.*, 2002).

Помимо трансформирования растений вектором со шпилечной конструкцией известны работы, в которых транзиентная РНК-интерференция достигалась трансформацией протопластов двудольных и однодольных растений непосредственно siРНК, а также dsРНК (An *et al.*, 2003; Vanitharani *et al.*, 2003; Bart *et al.*, 2006). Такие методологические подходы позволяют ускорить экспериментальный процесс с одной стороны и исследовать экспрессию генов, «выключение» которых губительно для растительной клетки.

Описана также технология у молкания генов с использованием miРНК. Так, с помощью сайт-направленного мутагенеза была заменена часть последовательности pre-miРНК на amiРНК (artificial miРНК) длиной 21 нуклеотид. Показано, что такое у молкание генов может быть конститутивным, индуцибельным и тканеспецифичным (Schwab *et al.*, 2006).

Феномен у молкания генов открыл широкие перспективы как для фундаментальной науки, так и для практического применения. В настоящее время уже имеются примеры использования механизма у молкания генов для

создания вирус- и стрессоустойчивых растений путем трансгенеза (Рукавцова и др., 2010; Arif *et al.*, 2012).

Работа поддержана интеграционным грантом № 84 СО РАН и грантом 12-II-CO-06-016 ДВО РАН.

ЛИТЕРАТУРА

- Дорохов Ю.Л. «Умолкание» генов у растений // Молекулярная биология. 2007. Т. 41. № 4. С. 579–592.
- Жимулев И.Ф., Беляева Е.С., Колесникова Т.Д., Волкова Е.И. Интеркалярный гетерохроматин и проблема сайленсинга // Информ. вестник ВОГиС. 2004. Т. 8. № 2. С. 81–85.
- Маренкова Т.В., Дейнеко Е.В. Инактивирование генов у растений на уровне транскрипции // Генетика. 2010. Т. 46. № 5. С. 581–592.
- Рукавцова Е.Б., Алексеева В.В., Бурьянов Я.И. Применение РНК интерференции в метаболической инженерии растений // Биоорганическая химия. 2010. Т. 36. № 2. С. 159–169.
- An C., Sawada A., Fukusaki E., Kobayashi A. A transient RNA interference assay system using *Arabidopsis* protoplasts // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2003. V. 67. P. 2674–2677.
- Anandalakshmi R., Pruss G.J., Ge X. *et al.* A viral suppressor of gene silencing in plants // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. No. 22. P. 13079–13084.
- Arif M., Azhar U., Arshad M. *et al.* Engineering broad-spectrum resistance against RNA viruses in potato // *Transgenic Res.* 2012. V. 21. No. 2. P. 303–311.
- Bart R., Chern M., Park C.-J. *et al.* A novel system for gene silencing using siRNAs in rice leaf and stem-derived protoplasts // *Plant Methods.* 2006. V. 2. P. 13–21.
- Bayne E.H., Rakitina D.V., Morozov S.Y., Baulcombe D.C. Cell-to-cell movement of potato potyvirus X is dependent on suppression of RNA silencing // *Plant J.* 2005. V. 44. No. 3. P. 471–482.
- Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M., Hannon G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference // *Nature.* 2001. V. 409. No. 6818. P. 363–366.
- Bollman K.M., Aukerman M.J., Park M.Y. *et al.* HASTY, the *Arabidopsis* ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis // *Development.* 2003. V. 130. No. 8. P. 1493–1504.
- Chen S., Hofius D., Sonnewald U., Börnke F. Temporal and spatial control of gene silencing in transgenic plants by inducible expression of double-stranded RNA // *Plant J.* 2003. V. 36. No. 5. P. 731–740.
- Contreras-Cubas C., Palomar M., Reyes J.L., Covarrubias A. Non-coding RNAs in the plant response to abiotic stress // *Planta.* 2012. V. 236. P. 943–958.
- Craft J., Samalova M., Baroux C. *et al.* New pOp/LhG4 vectors for stringent glucocorticoid-dependent transgene expression in *Arabidopsis* // *Plant J.* 2005. V. 41. P. 899–918.
- Earley K.W., Haag J.R., Pontes O. *et al.* Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics // *Plant J.* 2006. V. 45. P. 616–629.
- English J.J., Mueller E., Baulcombe D.C. Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes // *Plant Cell.* 1996. V. 8. No. 2. P. 179–188.
- Fagard M., Vaucheret H. Systemic silencing signal(s) // *Plant Mol. Biol.* 2000. V. 43. No. 2/3. P. 285–293.
- Guleria P., Mahajan M., Bhardwaj J., Yadav S.K. Plant small RNAs: biogenesis, mode of action and their roles in abiotic stresses // *Genomics, Proteomics and Bioinformatics.* 2011. V. 9. I. 6. P. 183–199.
- Hamilton A.J., Baulcombe D.C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants // *Science.* 1999. V. 286. No. 5441. P. 950–952.
- Haywood V., Yu T.S., Huang N.C., Lucas W.J. Phloem long-distance trafficking of gibberellic acid-insensitive RNA regulates leaf development // *Plant J.* 2005. V. 42. No. 1. P. 49–68.
- Helliwell C., Waterhouse P. Constructs and methods for high throughput gene silencing in plants // *Methods.* 2003. V. 30. P. 289–295.
- Helliwell C.A., Waterhouse P.M. Constructs and methods for hairpin RNA-mediated gene silencing in plants // *Methods Enzymol.* 2005. V. 392. P. 24–35.
- Himber C., Dunoyer P., Moissiard G. *et al.* Transitivity-dependent and independent cell-to-cell movement of RNA silencing // *EMBO J.* 2003. V. 22. No. 17. P. 4523–4533.
- Hirai S., Kodama H. RNAi vectors for manipulation of gene expression in higher plants // *Open Plant Sci. J.* 2008. V. 2. P. 21–30.
- Hirai S., Oka S., Adachi E., Kodama H. The effects of spacer sequence on silencing efficiency of plant RNAi vectors // *Plant Cell Rep.* 2007. V. 26. P. 651–659.
- Ji L., Chen X. Regulation of small RNA stability: methylation and beyond // *Cell Res.* 2012. V. 22. P. 624–636.
- Johansen L.K., Carrington J.C. Silencing on the Spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system // *Plant Physiol.* 2001. V. 126. No. 3. P. 930–938.
- Karimi M., Depicker A., Hilson P. Recombinational cloning with plant gateway vectors // *Plant Physiol.* 2007. V. 145. P. 1144–1154.
- Kasschau K.D., Carrington J.C. Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro // *Virology.* 2001. V. 285. No. 1. P. 71–81.
- Khraiwesh B., Zhu J.-K., Zhu J. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants // *BBA.* 2012. V. 1819. P. 137–148.
- Kurihara Y., Takashi Y., Watanabe Y. The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis // *RNA.* 2006. V. 12. No. 2. P. 206–212.
- Kurihara Y., Watanabe Y. *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. No. 34. P. 12753–12758.
- Lindbo J.A., Silva-Rosales L., Proebsting W.M., Dougherty W.G. Induction of a highly specific antiviral state in

- transgenic plants: implication for regulation of gene expression and virus resistance // *Plant Cell*. 1993. V. 5. No. 12. P. 1749–1759.
- Mallory A.C., Mlotshwa S., Bowman L.H., Vance V.B. The capacity of transgenic tobacco to send a systemic RNA silencing signal depends on the nature of the inducing transgene locus // *Plant J*. 2003. V. 35. No. 1. P. 82–92.
- Masclaux F.G., Charpentreau M., Takahashi T. *et al.* Gene silencing using a heat-inducible RNAi system in *Arabidopsis* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V. 321. P. 364–369.
- Matzke M., Aufsatz W., Kanno T. *et al.* Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing // *Biochim. Biophys. Acta*. 2004. V. 1677. No. 1/3. P. 129–141.
- Melnik C.W., Molnar A., Baulcombe D.C. Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals // *EMBO J*. 2011. V. 30. No. 17. P. 3553–3563.
- Mette M.F., Aufsatz W., van der Winden J. *et al.* Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA // *EMBO J*. 2000. V. 19. No. 19. P. 5194–5201.
- Miki D., Shimamoto K. Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice // *Plant Cell Physiol*. 2004. V. 45. P. 490–495.
- Mlotshwa S., Voinnet O., Mette M.F. *et al.* RNA silencing and the mobile silencing signal // *Plant Cell*. 2002. V. 14. Suppl: S289–S301.
- Nakahara K.S., Masuta C., Yamada S. *et al.* Tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNA silencing suppressors // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. No. 25. P. 10113–10118.
- Omarov R.T., Scholthof H.B. Biological chemistry of virus-encoded suppressors of RNA silencing: an overview // *Methods Mol. Biol.* 2012. No. 894. P. 39–56.
- Ratcliff F.G., MacFarlane S.A., Baulcombe D.C. Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between viruses // *Plant Cell*. 1999. V. 11. No. 7. P. 1207–1216.
- RNA Interference: Methods for Plants and Animals / Ed. T. Doran, C. Helliwell. CABI, 2009. 257 p.
- Ryabov E.V., van Wezel R., Walsh J., Hong Y. Cell-to-cell, but not long-distance, spread of RNA silencing that is induced in individual epidermal cells // *J. Virol.* 2004. V. 78. No. 6. P. 3149–3154.
- Schott G., Mari-Ordonez A., Himber C. *et al.* Differential effects of viral silencing suppressors on siRNA and miRNA loading support the existence of two distinct cellular pools of ARGONAUTE1 // *EMBO J*. 2012. V. 31. No. 11. P. 2553–2565.
- Schwab R., Ossowski S., Riester M. *et al.* Highly specific gene silencing by artificial micro RNAs in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2006. V. 18. P. 1121–1133.
- Schwach F., Vaistij F.E., Jones L., Baulcombe D.C. An RNA-Dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal // *Plant Physiol*. 2005. V. 138. No. 4. P. 1842–1852.
- Shams-Bakhsh M., Canto T., Palukaitis P. Enhanced resistance and neutralization of defense responses by suppressors of RNA silencing // *Virus Res*. 2007. V. 130. No. 1/2. P. 103–109.
- Shen W.J., Ruan X.L., Li X.S. *et al.* RNA silencing suppressor Pns11 of rice gall dwarf virus induces virus-like symptoms in transgenic rice // *Arch. Virol.* 2012. V. 157. No. 8. P. 1531–1539.
- Shivaprasad P.V., Chen H.M., Patel K. *et al.* A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site-leucine-rich repeats and other mRNAs // *Plant Cell*. 2012. V. 24. No. 3. P. 859–874.
- Sonoda S., Nishiguchi M. Graft transmission of post-transcriptional gene silencing: target specificity for RNA degradation is transmissible between silenced and non-silenced plants, but not between silenced plants // *Plant J*. 2000. V. 21. No. 1. P. 1–8.
- Sunkar R., Zhu J.K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2004. V. 16. P. 2001–2019.
- Tournier B., Tabler M., Kalantidis K. Phloem flow strongly influences the systemic spread of silencing in GFP *Nicotiana benthamiana* plants // *Plant J*. 2006. V. 47. No. 3. P. 383–394.
- Ueki S., Citovsky V. RNA commutes to work: Regulation of plant gene expression by systemically transported RNA molecules // *BioEssays*. 2001. V. 23. No. 12. P. 1087–1090.
- Vanitharani R., Chellappan P., Fauquet C.M. Short interfering RNA-mediated interference of gene expression and viral DNA accumulation in cultured plant cells // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. No. 2. P. 169632–169636.
- Vaucheret H., Vazquez F., Crete P., Bartel D.P. The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathways are crucial for plant development // *Genes Dev*. 2004. V. 18. P. 1187–1197.
- Voinnet O., Baulcombe D.C. Systemic signaling in gene silencing // *Nature*. 1997. V. 389. No. 6651. P. 553.
- Wassenegger M., Heimes S., Riedel L., Sanger H.L. RNA-directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants // *Cell*. 1994. V. 76. No. 3. P. 567–576.
- Wesley S.V., Helliwell C.A., Smith N.A. *et al.* Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants // *Plant J*. 2001. V. 27. P. 581–590.
- Wielopolska A., Townley H., Moore I. *et al.* A high-throughput inducible RNAi vector for plants // *Plant Biotechnol. J*. 2005. V. 3. P. 583–590.
- Yelin M.D., Chung S.M., Frankman E.L., Tzfira T. pSAT RNA interference vectors: a modular series for multiple gene down-regulation in plants // *Plant Physiol*. 2007. V. 145. P. 1272–1281.
- Yoo B.-C., Kragler F., Varkonyi-Gasic E. *et al.* A systemic small RNA signaling system in plants // *Plant Cell*. 2004. V. 16. No. 8. P. 1979–2000.
- Zentella R., Yamauchi D., Ho T.D. Molecular dissection of the gibberellin/abscisic acid signaling pathways by transiently expressed RNA interference in barley aleurone cells // *Plant Cell*. 2002. V. 14. P. 2289–2301.
- Zilberman D., Cao X., Jacobsen S.E. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation // *Science*. 2003. V. 299. No. 5607. P. 716–719.

**ROLE OF SMALL RNAs IN PLANT DEFENSE
AGAINST BIOTIC AND ABIOTIC STRESSES****V.I. Malinovsky¹, G.B. Borovskii², E.L. Gorbyleva^{2,3},
I.V. Fedoseeva^{2,3}, E.L. Tauson², V.A. Sokolov⁴, V.K. Voinikov²**

¹ Institute of Biology and Soil Science, Far East Branch, RAS, Vladivostok, Russia,
e-mail: ibss@eastnet.febras.ru

² Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS, Irkutsk, Russia,
e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru, dzubina@sifibr.irk.ru,
fedoseeva@sifibr.irk.ru, tauson@sifibr.irk.ru, vvk@sifibr.irk.ru;

³ National Research Irkutsk State University, Irkutsk, Russia;

⁴ Institute of Molecular and Cellular Biology, SB RAS, Novosibirsk, Russia

Summary

Small non-coding RNAs are a specific class of RNAs that regulate a variety of physiological processes in plants. Small RNAs (siRNAs and miRNAs), the pathways of formation and, particularly, their putative functions in plant defense against biotic and abiotic stresses are concisely reviewed. Techniques that enable use of this class of RNA as agents for managing plant resistance are discussed.

Key words: RNA interference, miRNA, siRNA, phytoviruses, viral suppressors, biotic stress.