



رنا نورمحمدی نظریان

گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

rana.nurmahammadi1993@gmail.com

¹Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

 <https://doi.org/10.22059/giahpzshsj.2025.408001.1029>

*چکیده

خاموشی ژن ناشی از میزبان (HIGS) Host-induced gene silencing فرآیندی است که در آن سلول‌های میزبان، می‌تواند بیان ژن‌های یک عامل بیماری‌زا مانند ویروس، باکتری، قارچ و یا آفت را سرکوب کند. این نوع خاموشی ژن، نوعی از تداخل RNA (RNAi) است که توسط سلول‌های یوکاریوتی (میزبان) برای تنظیم بیان ژن و دفاع در برابر عوامل بیماری‌زا به کار می‌رود. از آنجایی که قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی تهدیدی مداوم و جدی برای امنیت غذایی جهانی هستند و یکی از بزرگ‌ترین گروه از عوامل بیماری‌زای محصولات زراعی در کره زمین به شمار می‌روند، لذا استفاده از فرآیند HIGS، به دلیل کاربردهای بالقوه آن در حفاظت از محصولات و مدیریت بیماری مورد توجه قرار گرفته است. درک مکانیسم‌های اساسی HIGS برای استفاده از پتانسیل کامل آن و توسعه کاربردهای مؤثر در کشاورزی و بیوتکنولوژی بسیار مهم است. در این پژوهش به تعریف HIGS و جنبه‌های مهم کلی مکانیسم‌های خاموشی RNA، بررسی استراتژی‌هایی برای استفاده از خاموشی RNA جهت بررسی اساس بیماری‌زایی قارچی، جنبه‌های مهم توسعه مقاومت قارچی از طریق بیان ساختارهای خاموش‌کننده در گیاهان میزبان به عنوان راهبردی قدرتمند برای کنترل بیماری‌های قارچی، پیامدهای یافته‌های جدید در کاربرد HIGS به عنوان ابزاری برای مهندسی (ژنتیک) مقاومت در برابر بیماری و روش SIGS به عنوان ابزاری برای مطالعه مکانیسم‌های HIGS و نحوه عملکرد این روش می‌پردازیم.

کلمات کلیدی: خاموشی ژن ناشی از میزبان، تداخل RNA، قارچ‌های بیماری‌زا، مقاومت گیاهی، کنترل بیماری

*مقدمه

پدیده خاموشی ژن ناشی از RNA (که به عنوان تداخل RNA یا RNAi نیز شناخته می شود) نخستین بار بیش از ۳۰ سال پیش در گیاهان توصیف شد، زمانی که گیاهشناسان تلاش کردند یک ژن در گیاه گل اطلسی (*Petunia*) را که مسئول تولید رنگدانه بنفش (*Chalcone synthase ۱*) بود، بیش از حد بیان کنند. این ژن را با استفاده از یک مکانیسم خاموشی پس از رونویسی مهار کرد (Napoli et al. ۱۹۹۰). پدیده مشابهی نیز در این بازه زمانی در قارچها توصیف شد و به نام "Quelling" نام گذاری شد (Romano and Macino ۱۹۹۷; Cogoni and Macino ۱۹۹۲). Quelling، ابتدا در قارچ *Neurospora crassa* زمانی کشف شد که بیان نسخه های اضافی ژن های *albino-۱* یا *albino-۳* منجر به خاموش شدن نسخه های درون زای (endogenous) همان ژن ها گردید. اگرچه مکانیسم Quelling در آن زمان مشخص نبود، خاموش شدن ژن های آلبینو (*albino*) با کاهش سطوح mRNA مرتبط بود. مطالعات بعدی بر روی جهش های موسوم به QDE (quelling-defective)، نشان دادند که ژن های متناظر، پروتئین های هسته ای (core proteins) یا آنزیم های اصلی را کد می کنند که اکنون به عنوان واسطه های RNAi در یوکاریوت ها شناخته می شوند؛

از جمله: پلی مرز RNA وابسته به RNA-dependent RNA polymerase که همان QDE-۱ است (Cogoni and Macino ۱۹۹۹) و پروتئین آرگونات (Argonaute Protein (AGO)) که همان QDE-۲ است (Fagard et al. ۲۰۰۰). بیش از چندین سال پیش، Sanford and Johnston (۱۹۸۵) مفهوم مقاومت ناشی از انگل - parasite-derived resistance (PDR) را به عنوان یک استراتژی اصلی برای کنترل بیماری های گیاهی پیشنهاد کردند. در PDR، بیان یک ژن انگل در میزبان گیاهی، با توانایی رشد و نمو انگل تداخل ایجاد کرده و منجر به مقاومت در برابر بیماری می شود. شاید موفق ترین کاربرد PDR استفاده از گیاهان پاپایای تراریخته شده باشد که پروتئین پوششی ویروس لکه حلقوی پاپایا (Papaya ringspot virus (PSRV)) را بیان می کنند تا در برابر آلودگی ویروسی محافظت شوند (Gonsalves ۱۹۹۸). به استثنای ویروس ها، عموماً بر این باور بودند که عدم تبادل آسان مولکول های درشت بین میزبان و انگل، مانع بزرگی برای توسعه ی گسترده تر PDR خواهد بود. در طول یک دهه گذشته، کشف RNA های کوچک و روشن شدن مکانیسم های خاموش سازی RNA، شور و شوق دوباره ای به مقاومت ناشی از انگل (PDR) بخشیده است.

Nowara) *F. graminearum*, *Puccinia triticina* ۲۰۱۳. سويا: ژن‌های هدف برای *Fusarium oxysporum* (Kong et al. ۲۰۲۲). ذرت: ژن‌های هدف برای *Aspergillus flavus* (Raruang et al. ۲۰۲۰). موز ژن‌های هدف برای *F. oxysporum* (Ghag et al. ۲۰۱۴). باوجود اینکه HIGS یک استراتژی امیدوارکننده به نظر می‌رسد، مکانیسم‌هایی که از طریق آن‌ها این RNA های تنظیمی از گیاهان به بیمارگرها منتقل می‌شوند و اینکه چگونه باعث خاموش شدن ژن در بیمارگرها می‌شوند، به طور کامل شناخته شده نیستند، از جمله اینکه چگونه RNA های خاموش کننده از سلول‌های گیاهی ترشح می‌شوند و چگونه سلول‌های بیمارگر یا آفت این RNA ها را جذب می‌کنند. همچنین مشخص نیست که کدام پروتئین از گیاه و بیمارگر برای موفقیت HIGS موردنیاز است.

*مکانیسم کلی خاموشی RNA در

یوکاریوت‌ها

در چندین سال پیش، ناهنجاری‌های مشاهده شده در طول تلاش‌ها برای توصیف عملکردی ژن‌ها، منجر به کشف خاموشی ژن پس از رونویسی (post-transcriptional gene silencing (PTGS) شد.

امروزه، بر اساس پدیده خاموشی ژن گزارشگر، به شدت این نظریه مطرح است که مولکول‌های RNA می‌توانند بین میزبان و انگل‌ها جابه‌جا شوند (Tomilov et al. ۲۰۰۸; Westwood et al. ۲۰۰۹; Tinoco et al. ۲۰۱۰). شواهد تکمیلی نشان می‌دهند که خاموشی RNA، علاوه بر ویروس‌ها، در بسیاری از برهمکنش‌های گیاه-انگل، از جمله پاسخ گیاه به حشرات، باکتری‌ها، نماتدها و آلودگی‌های قارچی، نقش دارد (Huang et al. ۲۰۰۶; Katiyar-; Agarwal and Jin ۲۰۱۰; Mao et al. ۲۰۰۷; Ruiz-Ferrer and Voinnet ۲۰۰۹; Turner et al. ۲۰۰۶).

مطالعات متعددی در زمینه استفاده از HIGS در گیاهان زراعی انجام شده است تا در برابر عوامل بیماری‌زا، از جمله قارچ‌ها (Nowara et al. ۲۰۱۰; Koch et al. ۲۰۱۳) و اوومیسیت‌ها (Govindarajulu et al. ۲۰۱۵; Jahan et al. ۲۰۱۵)، مقاومت ایجاد شود. به عنوان مثال، از روش HIGS در بسیاری از محصولات مختلف برای هدف قرار دادن ژن‌های بیمارگر قارچی استفاده شده است که شامل موارد زیر است: جو (*Hordeum vulgare*): ژن‌های هدف برای قارچ‌های عامل *Blumeria graminis* و *Fusarium graminearum* (Nowara et al. ۲۰۱۳; Koch et al. ۲۰۱۰). گندم: ژن‌های هدف برای

microRNAs ها RNA میکرو (siRNAs)،
 tRNA- tRNA RNA ها ناشی از (miRNAs)،
 Piwi- derived RNA fragments (tRFs)
 interacting small RNAs (piRNAs). در حال حاضر،
 RNA siRNA ها و miRNA ها شناخته شده ترین رده های RNA
 کوچک در گیاهان و جانوران هستند و با جزئیات بیشتری
 مورد بحث قرار می گیرند. گرچه مشخص است که مسیرهای
 پردازش siRNA و miRNA مجزا هستند، اما در گیاهان،
 این مسیرها معمولاً در هسته آغاز می شوند. در هسته، آنزیم
 Dicer و اعضای خانواده ریبونوکلیاز (ribonuclease III
 RNase III) به RNA دو رشته ای بلند (dsRNA) یا
 RNA های با ساختار سنجاق سر (hairpin RNAs) متصل
 شده و آن ها را به ترتیب به siRNA یا miRNA پردازش
 می کنند. برخلاف گیاهان، در جانوران آنزیمی به نام
 Drosha وجود دارد (Baulcombe ۲۰۰۴; Carthew
 and Sontheimer ۲۰۰۹; Miyoshi et al. ۲۰۱۰;
 Sato et al. ۲۰۱۱). تا آنجا که ما می دانیم، نحوه ی خروج
 siRNA از هسته هنوز مشخص نیست. در مقابل،
 مولکول های RNA کوتاه با ساختار سنجاق سر (miRNA)
 که به صورت درونزا تولید می شوند، توسط پروتئین منافذ
 هسته ای به نام Exportin-۵ به سیتوپلاسم (مایع
 درون سلولی) منتقل می شوند (Katahira and
 Yoneda ۲۰۱۱; Kim ۲۰۰۴; Lund et al. ۲۰۰۴; Yi
 et al. ۲۰۰۳).

این پدیده در گیاهان به عنوان سرکوب هم زمان (CO-suppression)، در قارچ *Neurospora crassa*
 به عنوان خاموشی (quelling) و در *Caenorhabditis elegans* و سایر جانوران به عنوان تداخل RNA (RNAi) (Lee et al. ۱۹۹۳; Napoli et al. ۱۹۹۰; Romano and Macino ۱۹۹۲). تحقیقات بعدی نشان داد که بخش
 زیادی از دستگاه و مکانیسم های زمینه ای در سراسر
 ارگانیسم ها محافظت شده است.

خاموشی ژن پس از رونویسی (PTGS) را می توان به عنوان
 یک مکانیسم تنظیم کننده ی اختصاصی-توالی برای
 خاموشی بیان ژن دانست که توسط مولکول های RNA دو
 رشته ای بلند (dsRNA) یا RNA های با ساختار سنجاق سر
 (hairpin) راه اندازی می شود. این مولکول ها پردازش شده
 و به RNA های تک رشته ای به طول ۲۱ تا ۳۵ نوکلئوتید
 تبدیل می شوند. این RNA های کوتاه سپس با کمپلکس
 پروتئینی خاموشی ناشی از RNA توسط RNA-
 induced silencing complex (RISC) همراه شده و
 آن را به سمت رونوشت (transcript) هدف هدایت
 می کنند. در نهایت، این فرآیند منجر به تخریب mRNA یا
 سرکوب ترجمه می شود (شکل ۱) (Esquela-
 Kerscher and Slack ۲۰۰۶). مولکول های RNA
 کوچک به رده های مختلفی تقسیم می شوند، از جمله: RNA
 های تداخلی کوتاه (short interfering RNAs)

خانواده‌ی آرگونوت توصیف شده‌اند. به عنوان مثال، پروتئین AGO با RNA های کوچک ۲۱ تا ۲۵ نوکلئوتیدی (siRNA و miRNA) همراه می‌شود، در حالی که PIWI به مولکول‌های RNA بلندتر ۲۳ تا ۳۰ نوکلئوتیدی (piRNA) متصل شده و رونوشت‌های عناصر تکراری را خاموش می‌کند (Brennecke et al. ۲۰۰۷; Hartig et al. ۲۰۰۷). در این متن، ما به پروتئین‌های اصلی خاموش‌سازی RNA به عنوان Dicer ، Argonaute و RdRp اشاره می‌کنیم.

در قارچ‌ها، طی چند سال گذشته تعداد متنوعی از رده‌های RNA کوچک کشف شده است. اخیراً، RNA های شبیه میکرو RNA (microRNA-like RNAs (milRNAs)) در قارچ *Neurospora crassa* شناسایی شده‌اند (Lee et al. ۲۰۱۰). به نظر می‌رسد تکامل تولید milRNA ها به طور قابل توجهی با آنچه برای miRNA ها در گیاهان و جانوران گزارش شده، متفاوت است؛ بنابراین، این موضوع که آیا miRNA های واقعی در قارچ‌های رشته‌ای وجود دارند همچنان مورد بحث است.

در موارد دیگر، مولکول‌های کوتاه dsRNA ممکن است از منابع خارجی مانند ویروس‌هایی که در سلول‌های گیاهی تکثیر می‌شوند، حاصل شوند.

در سیتوپلاسم (مایع درون سلولی)، مولکول‌های کوتاه dsRNA که به صورت درون‌زا یا برون‌زا تولید شده‌اند، به dsRNA های کوچک پردازش شده و به کمپلکس RISC وارد می‌شوند. در اینجا، رشته مسافر (passenger strand) حذف می‌شود و رشته راهنما (guide strand) پروتئین آرگونوت (Argonaute) را برای تخریب اختصاصی رونوشت RNA هدف از طریق فعالیت ریبونوکلاز قطعه کننده آرگونوت یا برای تداخل با ترجمه هدایت می‌کند (Esquela-Kerscher and Slack ۲۰۰۶). این RNA های کوچک همچنین می‌توانند توسط آنزیم RNA پلیمراز وابسته به RNA (RNA dependent-RNA polymerase (RdRp)) به عنوان آغازگر برای سنتز مجدد dsRNA ها مورد استفاده قرار گیرند (Melnyk et al. ۲۰۱۱). این مرحله بسط (amplification) اطمینان می‌دهد که چندین دور از خاموشی RNA راه اندازی می‌شود. اعضای مختلفی از

RNA ها در قارچ *Mucor circinelloides* یافت

شده‌اند و به نظر می‌رسد منشأ درون‌زادی داشته باشند

(Jöchl et al. ۲۰۰۸).

✓ LTR retrotransposon-siRNAs (LTR-siRNAs)

این RNA ها در قارچ‌های

Aspergillus و *Magnaporthe oryzae*

fumigatus کشف شده‌اند و به نظر می‌رسد از عناصر

ژنتیکی متحرک بنام رتروترانسپوزون‌های LTR نشأت

گرفته باشند (Nicolas et al. ۲۰۱۰; Nunes et al. ۲۰۱۱).

✓ قطعات RNA ناشی از tRNA (tRFs): این

مولکول‌های کوچک از مولکول‌های بزرگ‌تر tRNA

(Transfer RNA) پردازش می‌شوند و در قارچ‌های

Aspergillus و *Magnaporthe oryzae*

fumigatus کشف شده‌اند (Nicolas et al. ۲۰۱۰; Nunes et al. ۲۰۱۱).

سایر RNA های کوچک در قارچ‌ها شامل موارد زیر هستند:

✓ RNA های کوچک برهم‌کنش‌دهنده با QDE-۲

(QDE-۲-) (qiRNAs) quelling-deficient ۲

(interacting small RNAs (qiRNAs): این

RNA ها در قارچ *Neurospora crassa* یافت

شده‌اند و با پروتئین QDE-۲ که نقشی در خاموشی

ژن دارد، برهم‌کنش می‌کنند (Lee et al. ۲۰۰۹, ۲۰۱۰).

✓ RNA های کوچک تداخلگر مستقل از

Dicer-independent (disiRNAs) Dicer

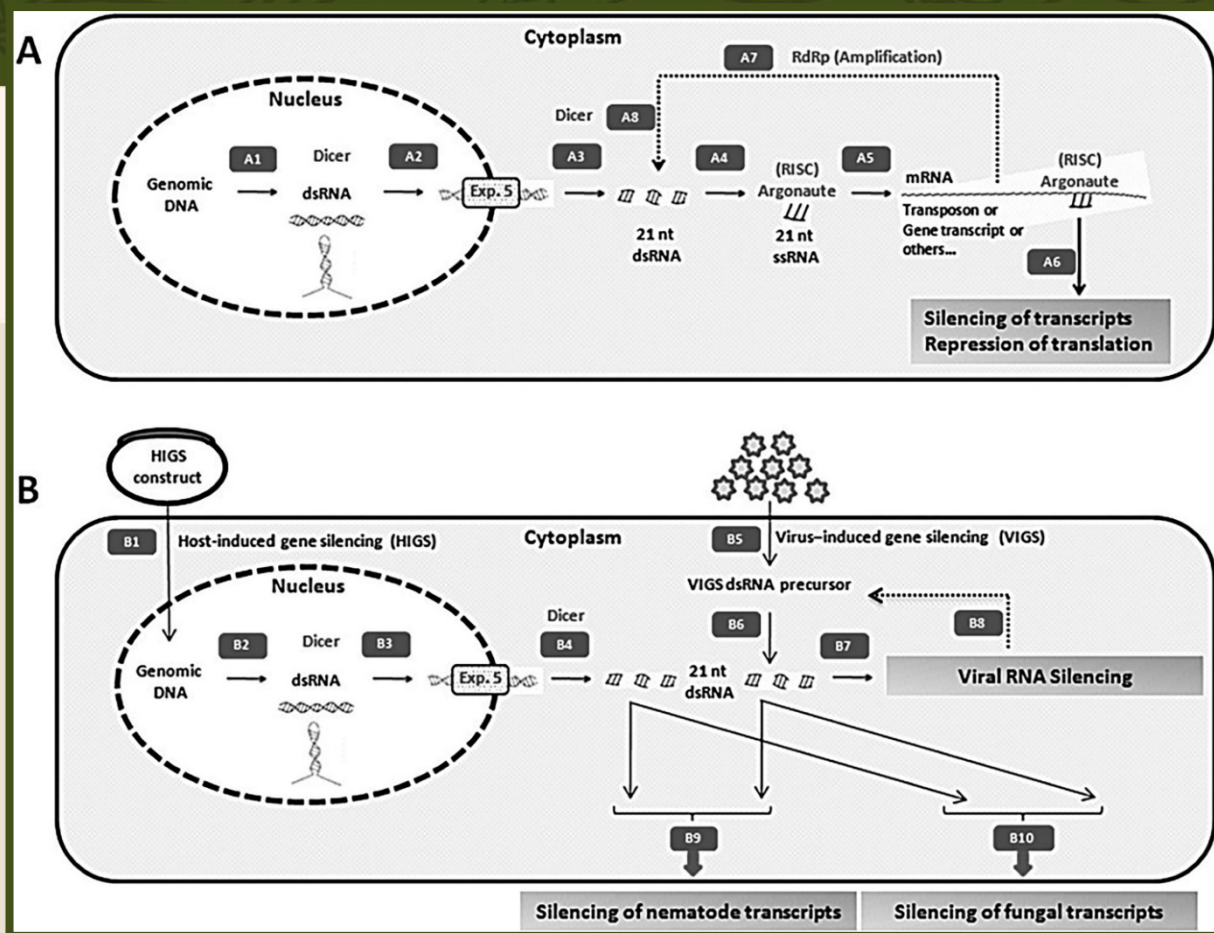
(small interfering RNAs (disiRNAs): این

RNA ها نیز در قارچ *N. crassa* کشف شده‌اند و

برای پردازش آن‌ها به آنزیم Dicer نیاز نیست (Lee et al. ۲۰۰۹, ۲۰۱۰).

✓ RNA های کوتاه درون‌زا (esRNAs)

(Endogenous short RNAs (esRNAs)): این



شکل ۱) مکانیسم کلی و کاربرد بالقوه خاموشی RNA برای توسعه راهبردهای کنترل بیماری‌های گیاهی (Nunes and Dean ۲۰۱۲). در سلول گیاهی (A)، خاموشی داخلی RNA با رونویسی مولکول‌های RNA دو رشته‌ای (dsRNA) یا سنجاق‌سر (hairpin) در هسته آغاز می‌شود (A۱). این مولکول‌های پیش ساز توسط آنزیم‌های ریبونوکلاز III (RNase III) مانند Dicer یا Drosha در حیوانات پردازش می‌شوند و مولکول‌های RNA تولید می‌کنند که توسط Exportin-۵ بارگیری و از هسته خارج می‌شوند (A۲). در سیتوپلاسم، dsRNAهای ۲۱ نوکلئوتیدی توسط فعالیت Dicer تولید می‌شوند (A۳). با حذف رشته مسافر، RNA تک رشته‌ای راهنما (ssRNA) با Argonaute (A۴) همراه می‌شود و کمپلکس پروتئینی خاموشی ناشی از RNA (RISC) را برای اتصال به رونوشت ژن داخلی هدف هدایت می‌کند (A۵) که منجر به تخریب رونوشت‌ها می‌شود (A۶). siRNA غیرمتصل از طریق عمل RNA پلیمراز وابسته به RNA (RdRp) به mRNA‌ها متصل می‌شود (A۷)؛ و dsRNA را دوباره سنتز می‌کند که توسط Dicer به مولکول‌های ۲۱ نوکلئوتیدی برش داده می‌شود (A۸) و منجر به تکثیر خاموشی RNA می‌شود. در سلول‌های گیاهی آلوده به بیمارگر (B)، الحاق (B۱) و رونویسی (B۲) ساختار خاموشی ژن ناشی از میزبان (HIGS) منجر به ایجاد مولکول‌های dsRNA یا سنجاق‌سر HIGS می‌شود که به مولکول‌های ۲۱ نوکلئوتیدی پردازش می‌شوند (B۳ و B۴ همان‌طور که در A توضیح داده شد). به‌طور جایگزین، از خاموشی ژن توسط ویروس ((Virus induced gene silencing (VIGS) (B۵) برای تولید پیش‌سازهای dsRNA ویروسی استفاده می‌شود که توسط Dicer به مولکول‌های dsRNA ۲۱ نوکلئوتید پردازش می‌شوند (B۶). مولکول‌های dsRNA ویروسی مستقیماً به خاموشی رونوشت‌های هدف ویروسی در سیتوپلاسم گیاه منجر می‌شوند (B۷). عملکرد RdRp گیاهی همچنین منجر به تکثیر خاموشی RNA ویروسی می‌شود (B۸). مولکول‌های HIGS dsRNA از سلول‌های گیاهی خارج‌شده و منجر به خاموشی اهداف نماتد در تغذیه نماتد (B۹) یا خاموشی رونوشت‌های قارچی در آلودگی قارچی (B۱۰) می‌شوند.

RNA های کوچک (small RNAs) به عنوان

تنظیم کننده سیستم ایمنی گیاهان

فعالیت اصلی sRNA ها خاموشی بیان ژن هدف بر اساس تطابق توالی است. sRNA های گیاهی بر اساس پیش ماده ها (precursors) و مسیرهای زیستی متفاوت خود به دودسته اصلی تقسیم می شوند: میکرو RNA ها (miRNAs) و RNA های کوچک تداخلگر (siRNA) (Chen ۲۰۰۹). پیش ماده های miRNA ها رونویسی های اولیه MIR هستند که ساختارهای حلقه ساقه داخلی (internal stem-loop structures) را تشکیل می دهند. در مقابل، siRNA ها از پیش ماده های RNA رشته ای بلند (dsRNA) به دست می آیند که با فعالیت آنزیم های RNA پلی مرز وابسته به RNA (RNA-dependent RNA polymerases= RDRs) ساخته می شوند. این آنزیم ها از مولکول های RNA خارجی (exogenous RNA molecules) مانند RNA های ویروسی و تراریخته یا رونویسی های داخلی به عنوان الگو استفاده می کنند. هر دو نوع miRNA و siRNA می توانند سیستم ایمنی گیاه را تنظیم کنند (Rosa et al. ۲۰۱۸).

میکرو RNA ها نقش مهمی در تنظیم رشد گیاهان ایفا می کنند، اما برخی از آن ها همچنین می توانند پاسخ های ایمنی را تعدیل کنند. سیستم ایمنی گیاهان از دوشاخه اصلی تشکیل شده است: ایمنی ناشی از الگو (pattern-

triggered immunity (PTI) و ایمنی ناشی از اثرگذار (effector-triggered immunity (ETI)). ایمنی ناشی از الگو (PTI) با درک سیگنال های غیرخودی به نام الگوهای مولکولی مرتبط با میکروب (microbe-associated molecular patterns (MAMPs)) فعال می شود. تحقیقات نشان داده اند که miRNA های خاص می توانند ایمنی ناشی از الگو (PTI) را تنظیم کنند که اغلب این کار از طریق تنظیم دقیق تعادل بین رشد و دفاع گیاه صورت می گیرد؛ به عبارت دیگر، برخی miRNA ها با کنترل دقیق، همزمان به رشد و دفاع گیاه کمک می کنند (Huot et al. ۲۰۱۴). برای مثال، miR۳۹۳ باعث تقویت دفاع در گیاه (*Arabidopsis thaliana*) در برابر باکتری بیماری زای *Pseudomonas syringae* (Navarro et al. ۲۰۰۶) و در سویا در برابر عامل بیماری زای موجودات قارچ مانند *Phytophthora sojae* می شود (Si-Ammour et al. ۲۰۱۱). القاء miR۳۹۳ منجر به خاموشی گیرنده های اکسین TIR۱ و AFB ها می شود که به طور بالقوه تعادل تخصیص انرژی (توزیع انرژی بین فرآیندهای مختلف در گیاه) را از رشد به سمت دفاع تغییر می دهد (Si-Parry et al. ۲۰۰۹; Ammour et al. ۲۰۱۱). miRNA ها همچنین می توانند گیرنده های ایمنی NB-LRR را که نقش اساسی در ایمنی ناشی از اثرگذار (ETI) ایفا می کنند، به طور مستقیم تنظیم کنند (Zhai et al. ۲۰۱۱).

منجر به ایجاد مقاومت با طیف گسترده شود. برخلاف نقش شناخته شده آن‌ها در دفاع ضد ویروسی، نقش siRNAها در طول آلودگی توسط عوامل بیماری‌زای غیر ویروسی اخیراً آشکار شده است.

نکات کلیدی:

- RNAهای کوچک (SRNA) تولید شده توسط گیاهان، در طی آلودگی طبیعی با عوامل بیماری‌زای غیر ویروسی، به عنوان عوامل ضد میکروبی متحرک عمل می‌کنند.
- عوامل مؤثر در خاموشی ژن ناشی از میزبان (HIGS) شامل microRNA های (miRNA) خاص و مجموعه‌ای از siRNA های کوچک مداخله‌گر (siRNA) هستند.
- siRNAهای ثانویه با استفاده از یک مکانیسم تصادفی (shotgun mechanism) به ژن‌های عوامل بیماری‌زا حمله کرده و آن‌ها را خاموش می‌کنند و بدین وسیله مقاومت ایجاد می‌کنند. این موضوع یک رقابت تسلیحاتی تکاملی بین گیاه و عوامل بیماری‌زا را تسهیل می‌بخشد.

در *Arabidopsis* سرکوب رونویسی زیرمجموعه‌ای از محل‌های *MIR* منجر به مقاومت در برابر باکتری بیماری‌زای *P. syringae* شد که با رفع سرکوب کلی بیان ژن‌های *NB-LRR* سازگار است (Cai et al. ۲۰۱۸). علاوه بر این، تنظیمات خاص *miRNA-NB-LRR* در تنباکو (Li et al. ۲۰۱۲)، گوجه‌فرنگی (Canto-Pastor et al. ۲۰۱۹) و جو (Liu et al. ۲۰۱۴) گزارش شده است.

در مقایسه با miRNAها، siRNAها به عنوان تنظیم‌کننده‌های شناخته شده دفاع گیاهی مطرح هستند. تحقیقات گسترده‌ای نقش siRNAهای ناشی از ویروس (vsiRNA) را در تجزیه RNAهای ویروسی و خاموشی رونویسی‌هایی که پروتئین‌های ویروسی را کد می‌کنند، نشان دادند (Guo et al. ۲۰۱۹). همچنین، القای vsiRNAs با تولید جمعیت زیادی از siRNAهای مشتق از رونویسی‌های گیاهی همراه است که اغلب شامل توالی‌های کد کننده هستند (Cao et al. ۲۰۱۴). گرچه عملکرد این siRNAهای فعال شده توسط ویروس (vasiRNAs) هنوز کاملاً مشخص نیست، اما یک فرضیه این است که آن‌ها می‌توانند برنامه‌ریزی مجدد رونویسی سراسری را در گیاهان آلوده واسطه کنند که ممکن است

خاموشی ژن‌های خاص کمک می‌کنند. این فرآیند شامل چند مرحله است:

✓ **siRNAهای اولیه** به رونوشت‌های هدف متصل

می‌شوند. این siRNAهای اولیه می‌توانند از منابع مختلفی مانند ویروس‌ها یا خود گیاه حاصل شوند.

✓ **اتصال siRNAهای اولیه** باعث سنتز RNA دو رشته‌ای

بلند می‌شود. این RNA دو رشته‌ای از روی رونوشت

هدف ساخته می‌شود و به‌عنوان الگو برای

تولید siRNAهای ثانویه عمل می‌کند.

✓ **RNA دو رشته‌ای** بلند توسط آنزیمی بنام Dicer به

قطعات کوچک‌تر بنام siRNAهای ثانویه پردازش می‌شود.

✓ **siRNAهای ثانویه** سپس می‌توانند به مولکول‌های

RNA دیگر در گیاه متصل شوند و آن‌ها را تجزیه

کنند. این فرآیند به خاموشی بیان ژن‌های هدف منجر می‌شود.

• siRNAهای هدفمند به بیمارگر ممکن است از

طریق وزیکول‌های خارج سلولی و سایر مسیرهای

مستقل از وزیکول خارج سلولی ترشح شوند.

• پیشرفت در درک فرآیند طبیعی خاموشی ژن

ناشی از میزبان (HIGS) از طریق siRNAهای

ثانویه، فرصت‌هایی را برای بهبود مهندسی

مقاومت در برابر بیماری‌ها فراهم می‌کند.

*نقش نوظهور siRNAهای ثانویه در ایمنی

گیاهان خاموش‌سازی توسط siRNA اغلب شامل فرآیند

تقویت سیگنال است که در آن siRNAهای اولیه، سنتز

RNA دو رشته‌ای بلند را از رونوشت‌های هدف هدایت

می‌کنند و منجر به تولید siRNAهای ثانویه ۲۱ و ۲۲

نوکلئوتیدی می‌شوند که قادر هستند ژن‌های هدف را

به‌صورت trans تنظیم کنند (Chen et al. ۲۰۰۷).

(Carthew and Sontheimer ۲۰۰۹).

این جمله یک فرآیند مولکولی در گیاهان را توصیف می‌کند

که در آن مولکول‌های کوچک RNA به نام siRNA

این فرآیند تقویت سیگنال نامیده می‌شود زیرا باعث افزایش تعداد siRNA هایی می‌شود که می‌توانند ژن‌های هدف را خاموش کنند. این به گیاهان اجازه می‌دهد تا به‌طور مؤثرتری با آلودگی‌ها مبارزه کنند.

در گیاهان خشکی‌زی، گروه خاصی از miRNA ها (معمولاً به طول ۲۲ نوکلئوتید) از طریق مسیری بسیار محافظت‌شده، تولید siRNA های ثانویه را از هر دو نوع RNA کد کننده و غیر کد کننده آغاز می‌کنند (Xia et al. ۲۰۱۳). این گروه از siRNA های ثانویه که از توالی‌های متنوعی تشکیل شده و بخش قابل توجهی از جمعیت داخلی siRNA را تشکیل می‌دهند، به تازگی نشان داده شده است که در دفاع گیاه نقش دارند. جهش یافته‌های مسیر siRNA ثانویه نقص‌های رشدی جدی ندارند؛ بلکه حساسیت بیشتری نسبت به عوامل بیماری‌زای یوکاریوتی نشان می‌دهند. در گیاه آرابیدوپسیس، جهش یافته‌هایی که تولید siRNA ثانویه در آن‌ها کاهش یافته بود، حساسیت بسیار بالایی نسبت به عوامل بیماری‌زای قارچی *Botrytis Verticillium dahliae.cinerea* و عامل بیماری‌زای موجودات قارچ مانند *Phytophthora capsici* نشان دادند (Ellendorff et al. ۲۰۰۹; Cai et al. ۲۰۱۸; Guo et al. ۲۰۱۹). فنوتیپ حساسیت بسیار زیادی که به این شکل ظاهر می‌شود، در گیاه برنج پس از آلوده شدن به قارچ بیماری‌زای *Magnaporthe oryzae* نیز

مشاهده و ثبت شده است (Wagh et al. ۲۰۱۶). این شواهد ژنتیکی از نقش گسترده مسیر siRNA ثانویه در ایمنی گیاه حمایت می‌کند. درحالی که تنظیم ژن‌های NB-LRR توسط siRNA ارتباط مستقیمی بین siRNA های ثانویه و ایمنی گیاه برقرار می‌کند، اما به راحتی نمی‌تواند توجیه کننده الگوی حساسیت به بیماری در گیاهان جهش یافته با نقص در تولید siRNA های ثانویه باشد. مطالعات اخیر در آرابیدوپسیس، راه حلی برای این معما ارائه می‌دهد. در این مطالعه، مشخص شد که siRNA های ثانویه با خاموشی ژن‌های هدف در عوامل بیماری‌زای مهاجم، مقاومت در برابر بیماری را افزایش می‌دهند.

اهداف اولیه شناخته شده miRNA هایی که تولید siRNA ثانویه را آغاز می‌کنند، شامل جایگاه غیر کد کننده ((noncoding TAS (trans-acting siRNAs)) و ژن‌های کد کننده پروتئین، به ویژه ژن‌هایی که (pentatricopeptide repeat (PPR)) و گیرنده‌های ایمنی NB-LRR را کد می‌کنند، هستند (Allen et al. ۲۰۱۱; Zhai et al. ۲۰۰۵). هر دو PPR و NB-LRR خانواده‌های ژنی بزرگی هستند. با تولید siRNA های ثانویه از تعداد کمی از رونویسی PPR و NB-LRR، سیگنال خاموشی به توالی‌های مشابه اهداف اولیه گسترش می‌یابد. بدین ترتیب، تعداد زیادی از ژن‌ها در همان خانواده می‌توانند تنظیم شوند.

کنترل انواع عوامل بیماری‌زای یوکاریوتی رشته‌ای و گیاهان انگلی مورد استفاده قرار گرفته است (Rosa et al. ۲۰۱۸). با این حال، تنها به تازگی جزئیات مولکولی HIGS در طول آلودگی طبیعی به عنوان جزء جدایی‌ناپذیر ایمنی گیاه کشف شده است.

اولین نمونه از HIGS به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی طبیعی در پنبه گزارش شد، جایی که مشاهده شد دو miRNA بنام‌های miR۱۵۹ و miR۱۶۶ ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی در قارچ *Verticillium dahliae* را خاموش می‌کنند (Guo et al. ۲۰۱۹). در این مطالعه، نویسندگان شواهد محکمی ارائه کردند که این miRNAهای ناشی از گیاه در میسلیم قارچی وجود داشته و برای خاموش کردن ژن در بیمارگر در دسترس هستند. پس از این کشف اولیه، مطالعات در آراییدوپسیس نشان می‌دهد که siRNAهای ثانویه نیز می‌توانند در طی آلودگی، ژن‌های بیمارگر را خاموش کنند. به‌طور خاص، نشان داده شد که دو tasiRNA که از رونویسی غیر کد کننده TAS به‌دست‌آمده‌اند، ژن‌های هدف را در قارچ بیماری‌زای *Botrytis cinerea* خاموش می‌کنند (Cai et al. ۲۰۱۸): و مجموعه‌ای از siRNAهای حاصل از زیرمجموعه‌ای از رونویسی PPR، ژن‌های هدف را در عامل بیماری‌زای *Phytophthora capsici* هدف قرار می‌دهند (Hou et al. ۲۰۱۹).

برای مثال، کاهش miR۴۸۲/۲۱۱۸ در گوجه‌فرنگی منجر به کاهش تولید siRNAهای ثانویه از رونویسی خاص-NB-LRR و افزایش مقاومت در برابر بیماری، احتمالاً از طریق فعال شدن چندین ژن NB-LRR شد (Canto-Pastor et al. ۲۰۱۹). همچنین، ساختارهای تنظیمی (مدارهای) مشابهی که شامل miRNA-NB-LRR-siRNA هستند، در گیاهانی مثل *Medicago truncatula*، سویا، سیب‌زمینی و جو نیز شناسایی شده‌اند (Zhai et al. ۲۰۱۴; Liu et al. ۲۰۱۱). این نتایج نشان می‌دهد که siRNAهای ثانویه خاص می‌توانند روی ژن‌های داخلی که در پاسخ دفاعی نقش دارند، به ویژه ژن‌های NB-LRR، تاثیر بگذارند.

* siRNAهای ثانویه به عنوان مجریان

(Executors) خاموشی ژن ناشی از میزبان

HIGS

عبارت (خاموشی ژن ناشی از میزبان) (HIGS) برای اشاره به این مشاهده ابداع شد که گیاهان تولیدکننده siRNAهای مصنوعی که برای هدف قرار دادن ژن (کوچک) خاصی در یک بیمارگر غیر ویروسی طراحی شده‌اند، می‌توانند ژن (کوچک) هدف را خاموش کرده و مقاومت در برابر بیمارگر را القا کنند. HIGS که ابتدا برای نماتدهای گره ریشه و حشرات به کار گرفته شد، برای مهندسی ژنتیک چندین محصول زراعی مهم کشاورزی به منظور

P. gaminis نیز تأثیر قابل توجهی بر سطح siRNA ثانویه دارد (Yin et al. ۲۰۱۹). Effector ها به عنوان پروب های مولکولی در نظر گرفته می شوند و شناسایی اجزاء و مکانیسم های ایمنی میزبان را تسهیل کرده اند. فعالیت های بیماری زایی PSR۲ و PgtSR۱ نشان دهنده نقش مهم siRNA های ثانویه در دفاع گیاهی در طی آلودگی قارچی و *Phytophthora* است.

*مقایسه siRNA ها و miRNA ها به عنوان

عوامل خاموش کننده ژن (میان میزبان و

بیمارگر)

هردوی miRNA و siRNA در HIGS نقش دارند، اما هرکدام مزایای خاص خود را در خاموشی ژن های هدف در بیمارگرها دارند. به طور کلی، miRNA ها فراوانی بیشتری دارند که کارایی خاموشی ژن را تسهیل می کند. جالب اینجاست که miR۱۶۶ و miR۱۵۹ که به خاموشی ژن های هدف در *V. dahliae* کمک می کنند، از فراوان ترین miRNA ها در پنبه و آرابیدوپسیس هستند و ژن های MIR مربوط به آن ها در طی آلودگی بیشتر القا می شوند (Zhang et al. ۲۰۱۶). با توجه به اینکه تنظیم ژن توسط sRNA وابسته به دوز (dosage-dependent) است، miRNA های بسیار فراوان

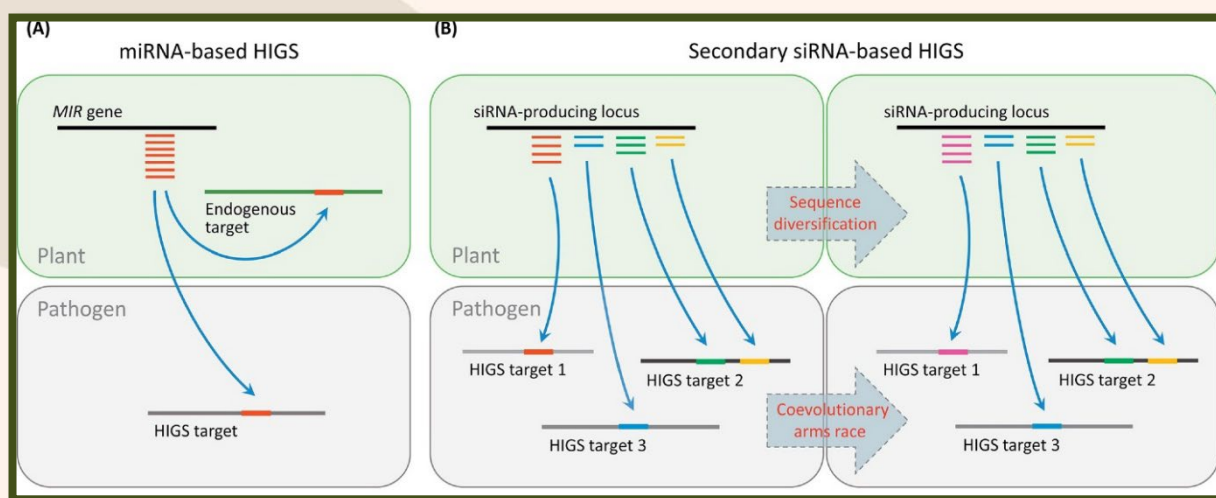
می توانند برای استفاده در HIGS مفید باشند

این نتایج با فنوتیپ حساسیت بیش از حد جهش یافته *rdr۶* آرابیدوپسیس که در تولید siRNA ثانویه مختل شده است، به *B. cinerea* و *P. capsici* مطابقت دارد (Cai et al. ۲۰۱۹; Guo et al. ۲۰۱۸; Hou et al. ۲۰۱۸). قابل ذکر است که جهش یافته *rdr۶* و همچنین سایر جهش یافته ها در مسیر مشابه siRNA ثانویه، به *V. dahliae* نیز حساسیت بیش از حد نشان دادند (Ellendorff et al. ۲۰۰۹) که نشان می دهد علاوه بر miRNA ها، siRNA های ثانویه نیز در دفاع گیاه در برابر این قارچ بیماری زا نقش دارند. مطابق با نقش siRNA های ثانویه در ایمنی گیاه، عوامل بیماری زا پروتئین های مؤثری را تکامل داده اند که مسیر siRNA ثانویه را هدف قرار می دهند تا بیماری را ترویج کنند. این پروتئین های مؤثر، عوامل ضروری برای بیماری زایی هستند که به طور مستقیم اهداف میزبان را برای پیشبرد توسعه بیماری دست کاری می کنند. هر دو گونه قارچ بیماری زای *Phytophthora* و قارچ بیماری زای *Puccinia graminis* ، پروتئین های مؤثری را کدگذاری می کنند که مسیر خاموش سازی RNA را در داخل گیاهان میزبان سرکوب می کنند (Qiao et al. ۲۰۱۳; Xiong et al. ۲۰۱۴; Qiao et al. ۲۰۱۵; Yin et al. ۲۰۱۹; Zhang et al. ۲۰۱۹). جالب توجه است که پروتئین مؤثر PSR۲ قارچ فیتوفتورا به طور خاص تکامل siRNA ثانویه را در آرابیدوپسیس تحت تأثیر قرار می دهد (Qiao et al.

در مقایسه با miRNAها، siRNAهای ثانویه ویژگی‌های خاص خود را دارند که برای عملکرد به عنوان عوامل ضد میکروبی مناسب هستند siRNAهای ثانویه نشان‌دهنده مجموعه‌ای از توالی‌های متنوع هستند که می‌توانند چندین مکان را در یک رونویسی، چندین رونویسی در یک بیمارگر و همچنین چندین بیمارگر را هدف قرار دهند. PPRهای مشتق شده از siRNA در آرابتوپسیس نمونه خوبی از این موضوع هستند (Hou et al. ۲۰۱۹). بخش قابل توجهی از siRNAهای ثانویه در آرابتوپسیس تقریباً از ۱۰ رونوشت PPR مشتق شده‌اند و بیوسنتز آن‌ها به تعداد کمی از عوامل آغازگر sRNA نیاز دارد (Chen et al. ۲۰۰۷)؛ اگرچه siRNAهای PPR به طور مداوم تولید می‌شوند، اما یکی از این عوامل آغازگر sRNA، miR۱۶۱، با درک بیمارگر القا می‌شود و منجر به افزایش تولید مجموعه‌ای از تقریباً ۴۰۰۰ siRNA مشتق شده از PPR با توالی‌های متنوع می‌شود. پیش‌بینی هدف، ۲۴۹ ژن را در بیمارگر *P. capsici* شناسایی کرد که می‌توانند به طور بالقوه توسط ۴۳۷ siRNA مشتق شده از PPR خاموش شوند (Hou et al. ۲۰۱۹). خاموش کردن هم‌زمان چندین هدف به طور فرضی کارایی مهار بیمارگر را افزایش می‌دهد. همچنین می‌توان اهداف بالقوه siRNAهای مشتق شده از PPR را از قارچ بیماری‌زای *V. dahliae* و احتمالاً سایر بیمارگرها پیش‌بینی کرد (Hou et al.).

۲۰۱۹) که نشان می‌دهد این مجموعه siRNAها می‌توانند مقاومت با طیف وسیع ایجاد کنند. sRNAها خاموشی ژن را از طریق تطابق توالی هدایت می‌کنند. در طول نبرد دائمی با گیاهان، انتظار می‌رود که افراد در جمعیت بیمارگر که بازهای جهش‌یافته در جایگاه هدف sRNA میزبان را تکامل می‌دهند، برای اجتناب از دفاع مبتنی بر HIGS انتخاب شوند. برای حفظ فعالیت ضد میکروبی، توالی sRNAهای میزبان نیز باید دائماً تغییر کند. برخلاف این پویایی تکاملی ناشی از نبرد تسلیحاتی، miRNAها اغلب محافظت شده هستند که با نقش آن‌ها در تنظیم اهداف داخلی مطابقت دارد (شکل ۲-۱). علاوه بر هدف قرار دادن ژن‌های بیمارگر، miR۱۵۹ و miR۱۶۶ هر دو miRNAهای محافظت‌شده‌ای هستند که اهداف ژنی محافظت‌شده را در گیاهان تنظیم می‌کنند. miR۱۵۹ تغییرات فاز رویشی را با هدف قرار دادن عوامل رونویسی MYB تنظیم می‌کند (Alonso-Peral et al. ۲۰۱۰) و miR۱۶۶ با تنظیم هموستاز اسید آبسازیک (abscisic acid homeostasis) در پاسخ به خشک‌سالی درگیر است (Yan et al. ۲۰۱۶). از آنجایی که آن‌ها برای HIGS (تعیین نشده‌اند)، فرگشت توأم این miRNAها با بیمارگرها محدود است. تنوع توالی miRNAها نیز محدود است زیرا آن‌ها توسط ژن‌های MIR کدگذاری می‌شوند و رونوشت‌های اولیه باید ساختار ساقه-حلقه (stem-loop structure) مشخصی را تشکیل دهند.

برعکس، تغییرات توالی در siRNAهای ثانویه را می‌توان به راحتی انجام داد به شرطی که جایگاه‌های هدف miRNA در رونوشت‌های اولیه برای شروع تولید پیش‌سازهای dsRNA بلند محافظت شود. ژن‌های غیر کد کننده محدودیت کمتری در تنوع توالی دارند. جالب اینجاست که برخی از رونوشت‌های کدگذاری که siRNA تولید می‌کنند نیز دینامیک تکاملی را نشان می‌دهند که ممکن است نشان‌دهنده یک نبرد تسلیحاتی باشد. برای مثال، زیر خانواده RFL (restorer-of fertility-like) ژن‌های *PPR* که siRNAهای ثانویه تولید می‌کنند، تحت انتخاب متنوع کننده قرار می‌گیرند که با انتخاب خالص کننده مشاهده شده در سایر ژن‌های *PPR* که عملکرد آن‌ها به محصولات پروتئینی آن‌ها بستگی دارد، متفاوت است (Fujii *et al.* ۲۰۱۳; Dahan and Mireau ۲۰۱۱). علاوه بر این، رویکرد «شلیک گلوله shotgun» که توسط siRNAهای ثانویه استفاده می‌شود، به احتمال کمتری توسط بیمارگرها از طریق جهش در جایگاه هدف به سرعت شکست می‌خورد (شکل ۲- ۲- B۲). در مجموع، siRNAهای ثانویه به حفظ مجموعه‌ای متنوع از dsRNAهای ضد میکروبی کمک می‌کنند که در چارچوب بین میزبان و بیمارگر برای دفاع گیاهی مبتنی بر HIGS مفید خواهد بود.



شکل ۲) مقایسه HIGS مبتنی بر miRNA و siRNA ثانویه (Hou and Ma ۲۰۲۰)

مهاجم دارند. فرگشت توأم miRNAها با عوامل بیماری‌زا محدود است زیرا تطابق توالی برای تنظیم اهداف داخلی باید حفظ شود.

(A۱) MiRNAها عمدتاً از یک توالی محافظت شده در رونوشت‌های پیش ساز حاصل می‌شوند و بنابراین تعداد محدودی از اهداف را هم در گیاه و هم در عوامل بیماری‌زای

(B2) جمعیت siRNAs ثانویه با توالی‌های متنوع از رونوشت‌های اولیه کد کننده یا غیر کد کننده تولید می‌شوند و چندین هدف ژنی را در یک عامل بیماری‌زای مهاجم تنظیم می‌کنند. این مکانیسم «شلیک گلوله» پایداری دفاع مبتنی بر siRNA ثانویه را افزایش می‌دهد زیرا در برابر تکامل عوامل بیماری‌زا از طریق تغییرات توالی (برای مثال، تغییرات محل هدف که در هدف ۱ سیستم خاموشی ژن ناشی از میزبان (HIGS) نشان داده شده است) مقاومت بیشتری دارد. siRNAs ثانویه همچنین می‌توانند از طریق تنوع توالی رونوشت‌های اولیه در یک رقابت تسلیحاتی با عوامل بیماری‌زا شرکت کنند. خطوط بارنگ‌های مختلف نشان‌دهنده توالی‌های siRNA متفاوت یا توالی‌های مکمل آن‌ها در رونوشت‌های هدف هستند.

*ترشح sRNAهای هدفمند به بیمارگر از

سلول‌های گیاهی

یکی از فرآیندهای کلیدی خاموشی ژن ناشی از میزبان (HIGS) انتقال sRNAهای گیاهی از سلول‌های میزبان به بیمارگر مهاجم است. در آنجا، مکانیسم خاموشی RNA ربوده می‌شود تا اهداف خاص بیمارگر که در آلودگی نقش دارند، خاموش شوند. با اینکه شناخته شده است که sRNAها به عنوان مولکول‌های سیگنال دهنده با قابلیت تحرک بالا عمل می‌کنند، اما مکانیسم‌های زمینه‌ای حرکت آن‌ها

همچنان نامشخص است (Liu and Chen ۲۰۱۸). جالب‌توجه است که تحرک RNA ممکن است ارتباط مستقیمی با فراوانی آن نداشته باشد. به عنوان مثال، miR168 بسیار فراوان در پنبه در سلول‌های قارچ *V. dahliae* شناسایی نشد (Zhang et al. ۲۰۱۶). مشاهده مشابهی نیز در تبادل mRNA بین گیاه انگلی *Arabidopsis* و *Cuscuta pentagona* انجام شد. اگرچه بیشتر رونوشت‌های متحرک بسیار فراوان بودند، اما بسیاری از رونوشت‌های فراوان تحرک کمی از خود نشان دادند (Kim et al. ۲۰۱۴). این یافته‌ها نشان‌دهنده وجود یک مکانیسم جداسازی است که می‌تواند ترافیک sRNA و mRNA بین میزبان‌های گیاهی و بیمارگرها/انگل‌های مهاجم را تعیین کند.

اولین مرحله در انتقال sRNA در HIGS، خروج sRNAها از سلول‌های گیاه است. دانش ما در مورد مسیرهای ترشحی گیاهان عمدتاً از طریق تحقیق بر روی ترشح پروتئین به دست آمده است. مسیر ترشح رایج شامل مسیر کلاسیک شبکه آندوپلاسمی -دستگاه گلژی (endoplasmic reticulum (ER)-Golgi) است که در آن پروتئین‌ها در پلی‌زوم‌های متصل به غشا (membrane-bound polysomes (MBPs)) روی شبکه آندوپلاسمی زیر ساخته شده و از طریق وزیکول‌های جوانه‌زن به دستگاه گلژی منتقل می‌شوند.

مولکول‌های مختلف RNA هستند و حمل miRNA از طریق EVs نشان داده شده که نقش کلیدی در ارتباطات بین‌سلولی دارد (Valadi et al. ۲۰۰۷)، EVs گیاهان نیز برای انتقال sRNA مورد بررسی قرار گرفته‌اند. تجزیه و تحلیل‌های اخیر وجود sRNA را در EVs تأیید می‌کند (Cai et al. ۲۰۱۸; Baldrich et al. ۲۰۱۹)، با این حال ترکیب محموله‌های sRNA همچنان نامشخص است. تحلیل اخیر پروفایل sRNA نشان می‌دهد که وفور کلی miRNA ها و siRNA ها در EVs آراییدوپسیس کم است (Baldrich et al. ۲۰۱۹)؛ در عوض، RNA های ریز ۱۰-۱۷ نوکلئوتیدی (tyrNAS) به شدت غنی هستند. به نظر می‌رسد این tyrRNA ها محصولات تخریب RNA هستند با این حال، عملکرد دقیق آن‌ها در تنظیم ژن هنوز ناشناخته است (Baldrich et al. ۲۰۱۹). این یافته، ایده نقش EVs را به عنوان مسیر اصلی ترشح برای انتقال گسترده sRNA در فرآیندهایی مانند خاموشی ژن ناشی از میزبان (HIGS) در گیاهان تضعیف کرد. با وجود این، miRNA های خاص و siRNA های ثانویه همچنان در EVs وجود دارند که نشان‌دهنده حفظ یک کانال ارتباطی انتخابی و هدفمند است. به عنوان مثال، siRNAs و tasiRNA های مشتق شده از PPR که نشان داده شده است ژن‌های بیماری‌زا را خاموش می‌کنند، اگرچه غنی نشده بودند، در EVs آراییدوپسیس وجود داشتند.

این وزیکول‌ها در نهایت پس از عبور از (trans-Golgi network (TGN) با غشای پلاسمایی ادغام شده و محتوای خود را که می‌تواند توسط سلول دیگری از طریق اندوسیتوز جذب شود، آزاد می‌کنند (Ding et al. ۲۰۱۴). یک مسیر دیگر ترشح، مسیر غیرمتعارف است که مستقل از دستگاه گلژی بوده و شامل وزیکول‌های خارج سلولی (extracellular vesicles (EVs)) می‌شود. اندامک‌های کوچک غشادار هستند که توسط سلول‌ها به محیط اطرافشان آزاد می‌شوند. یک دسته اصلی از این وزیکول‌ها، اگزوزوم‌ها هستند که منشأ آن‌ها وزیکول‌های (intraluminal vesicles (ILVs)) تشکیل شده در سیتوزول بوده و درون محفظه‌های اندوزومی به نام اجسام چندوزیکولی (multivesicular bodies (MVBs)) محصور می‌شوند. این وزیکول‌ها هنگامی که MVB ها با غشای پلاسمایی ادغام شده و به آپوپلاست (فضای خارج از سلول گیاهی) رها می‌شوند، آزاد می‌گردند (Yanez-Mo et al. ۲۰۱۵). محتوای EVs سپس از طریق اندوسیتوز به سلول گیرنده منتقل می‌شود (Colombo et al. ۲۰۱۴). همان‌طور که در گیاهان، وزیکول‌های خارج سلولی (EVs) سرشار از پروتئین‌ها و متابولیت‌های ضد میکروبی هستند (Rutter and Innes ۲۰۱۷; Regente et al. ۲۰۱۷)، نشان می‌دهد که آن‌ها در دفاع گیاه نقش دارند. از آنجایی که محموله‌های EVs در سلول‌های حیوانی شامل

به‌طور مداوم تولید می‌شود، اگرچه ممکن است در هنگام تشخیص بیمارگر برای مکانیسم نظارتی بیشتر القا شود. ترشح آن‌ها برای جلوگیری از خاموش شدن ناخواسته ژن‌های درونی (endogenous genes) مهم است.

*انتقال sRNA در تعاملات گیاه-عامل

بیماری‌زا

پس از ترشح، sRNAهای گیاهی برای خاموشی ژن‌های هدف، نیاز به ورود به سلول‌های عامل بیماری‌زا دارند. جهت تبادل فعال مواد، ساختارهای تخصصی به نام هاستوریوم (haustoria) شکل می‌گیرد. هاستوریوم‌ها توسط عوامل بیماری‌زای قارچی رشته‌ای یوکاریوتی بیوتروف/همی‌بیوتروف ساخته می‌شوند و جذب مواد مغذی و انتقال عوامل مؤثر (effector) را تسهیل می‌کنند (Casadevall et al. ۲۰۰۹; Micali et al. ۲۰۱۱; Wang et al. ۲۰۱۷). هاستوریوم‌ها همچنین پورتال‌هایی هستند که مواد ضد میکروبی تولید و صادر شده توسط گیاه میزبان آن‌ها را هدف قرار می‌دهند (Micali et al. ۲۰۱۱). هاستوریوم‌ها که توسط یک غشای پلاسمایی اصلاح شده گیاهی به نام غشای خارج-هاستوریوم (extrahaustorial membrane (EHM)) احاطه شده‌اند، از سلول میزبان توسط ماتریکس خارج-هاستوریوم (extrahaustorial matrix (EHMx)) که در آن دیواره سلولی گیاه وجود ندارد، جدا می‌شوند (شکل ۳).

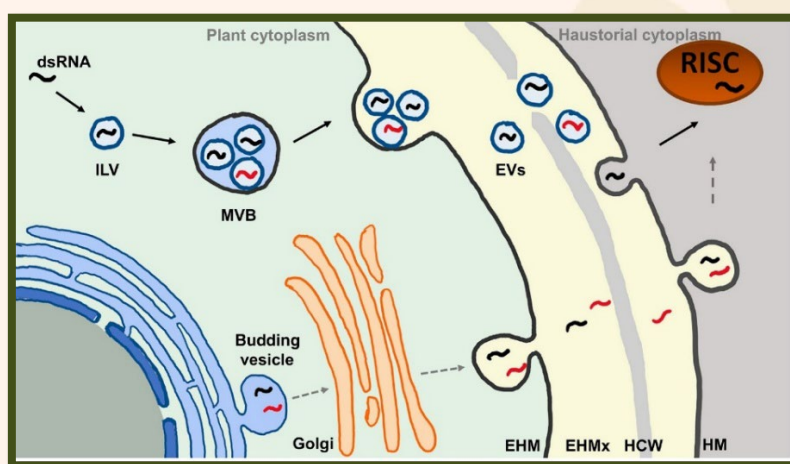
جالب توجه است که فراوانی siRNA مشتق شده از PPR که یک ژن *P. capsici* را هدف قرار می‌دهد، در EVs جدا شده از برگ‌های آرابیدوپسیس آلوده به *P. capsici* افزایش یافته است (Hou et al. ۲۰۱۹)، این امر نشان‌دهنده این احتمال است که محموله‌های EV ممکن است در طول آلودگی به‌عنوان یک پاسخ دفاعی تغییر کنند. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که برخی miRNAs و بسیاری از siRNAهای ثانویه در فضای آپوپلاست غنی شده‌اند اما در EVs یافت نمی‌شوند که این نشان می‌دهد sRNAها می‌توانند از طریق مسیرهای مستقل از EV ترشح شوند (Baldrich et al. ۲۰۱۹). بخش‌بندی سیتوپلاسمی کلاس‌های مختلف sRNA در گیاهان مشاهده شده است. جالب اینکه، گروهی از miRNAs و siRNAs با MBP مرتبط هستند و این ارتباط برای شروع تولید siRNA ثانویه که ممکن است در شبکه آندوپلاسمی زبر نیز رخ دهد، ضروری است (Li et al. ۲۰۱۶)؛ بنابراین می‌توان حدس زد که بیوسنتز siRNAهای ثانویه ممکن است با ترشح آن‌ها مرتبط باشد که به‌طور فرضی با مسیر شبکه آندوپلاسمی-دستگاه گلژی ارتباط دارد. درواقع، آنزیم‌های ضروری برای تولید siRNA ثانویه، از جمله RDR۶، به اصطلاح «بدنه‌های siRNA» یافت شده‌اند که اغلب در مجاورت گلژی قرار دارند (de Alba et al. ۲۰۱۵; Yu et al. ۲۰۱۷). ارتباط بالقوه بیوسنتز و ترشح siRNAهای ثانویه به عملکرد آن‌ها به‌عنوان عوامل HIGS کمک می‌کند.

قابل توجه است که این جمعیت بزرگ و متنوع siRNA

باید برای تأثیرگذاری قابل توجه بر بیان ژن هدف کافی باشد.

انتقال SRNA بین گیاهان و عوامل بیماری‌زای عمومی نکروتروف که ساختارهای تخصصی جهت آلودگی مانند هاستوریوم تولید نمی‌کنند، ممکن است دینامیک‌های تعاملی متفاوتی داشته باشد. قارچ بیماری‌زای عمومی نکروتروف مدل *B. cinerea* نشان داده شده است که SRNAهای خارجی، RNAهای دو رشته‌ای بلند و همچنین EVهای تصفیه شده را از محیط جذب می‌کند (Wang et al. ۲۰۱۶; Cai et al. ۲۰۱۸). از آنجایی که *B. cinerea* برای آسیب رساندن به سلول‌های میزبان، انواع آنزیم‌های تخریب‌کننده دیواره سلولی و متابولیت‌های سمی تولید می‌کند (Zhang et al. ۲۰۱۹)، زمان‌بندی تولید و ترشح SRNA در رابطه با رویدادهای آسیب/مرگ سلولی برای دفاع کارآمد از طریق HIGS حیاتی است

در سلول‌های گیاهی، توده‌های گلژی، شبکه آندوپلاسمی، وزیکول‌های ترشحی و MVBها در مجاورت EHM تجمع می‌یابند که نشان می‌دهد SRNAها می‌توانند به طور فعال از طریق EHM منتقل شوند و سپس توسط سلول‌های عامل بیماری‌زا از طریق اندوسیتوز جذب شوند (Takemoto et al. ۲۰۰۳; Lu et al. ۲۰۱۲). همچنین، SRNAهای تولیدشده توسط گیاهان انگلی برای خاموشی اهداف میزبان، در هاستوریوم‌ها غنی شده‌اند (Shahid et al. ۲۰۱۸). این مشاهدات نشان می‌دهند که هاستوریوم‌ها ممکن است یک پورتال اصلی برای انتقال SRNA باشند. قابل درک است که SRNAهای ترشح شده از سلول‌های گیاهی از طریق مسیرهای وابسته و/یا مستقل از EV می‌توانند در EHMx متمرکز شوند. این مهم است زیرا کارایی خاموشی ژن توسط مقدار SRNAها تعیین می‌شود؛ و مقدار SRNAهای هدفمند انتقال یافته به عامل بیماری‌زا



شکل ۳) یک مدل فرضی از چگونگی جابه‌جایی RNAهای کوچک (SRNA) بین سلول‌های گیاهی و سلول‌های بیماری‌زا از طریق هاستوریوم را نشان می‌دهد (Hou and Ma ۲۰۲۰).

*چشم‌اندازهای آینده و کاربردهای HIGS

برای مهندسی مقاومت (ژنتیک) در برابر

بیماری

پژوهش در مورد مکانیسم‌های ایمنی گیاهان، فرصت‌های هیجان‌انگیزی را برای مهندسی مقاومت در برابر بیماری در محصولات زراعی فراهم کرده است. اگرچه تلاش‌های مداوم برای استفاده از خاموشی ژن ناشی از میزبان (HIGS) برای افزایش مقاومت انجام شده است، نتایج به دست آمده متغیر بوده است. اکتشافات اخیر در زمینه خاموشی ژن بین ارگانیسمی در طول آلودگی طبیعی، راه‌هایی را برای بهبود ارائه می‌دهد.

تحقیقات بر روی نحوه دفاع گیاهان در برابر بیماری‌های مختلف، منجر به ایده‌های نوآورانه‌ای برای افزایش مقاومت محصولات کشاورزی در برابر بیماری‌ها شده است. درحالی‌که دانشمندان به‌طور مداوم در حال بررسی استفاده از HIGS برای تقویت مقاومت گیاهان هستند، نتایج به دست آمده تاکنون یکسان و قطعی نبوده است. با این حال، کشفیات اخیر در مورد خاموشی ژن بین ارگانیسم‌ها در طی آلودگی طبیعی، چشم‌اندازهای جدیدی را برای بهبود این روش ارائه می‌دهد.

در سیتوپلاسم گیاه، srRNAها (RNAهای کوچک) ممکن است به صورت دوتایی (dsRNA) به داخل intraluminal vesicles (ILVs) وارد شوند که متعاقباً توسط اجسام چندوزیکولی multivesicular bodies (MVBs) بلعیده می‌شوند. MVBها ممکن است با extrahaustorial membrane (EHM) ادغام شوند و وزیکول‌های خارج سلولی extracellular vesicles (EVs) را به extrahaustorial matrix (EHMx) آزاد کنند. وزیکول‌های خارج سلولی (EVs) ممکن است از طریق اندوسیتوز با غشای هاستوریومی (haustorial membrane) ادغام شوند و بارهای srRNA خود را در سلول‌های مهاجم تخلیه کنند. هنگامی که در داخل سیتوپلاسم بیمارگر قرار می‌گیرند، srRNAهای گیاهی ممکن است با ربودن کمپلکس خاموشی ژن ناشی از RNA ((RNA-induced gene silencing (RISC) یک یا چند ژن هدف را خاموش کنند. مسیر ترشح دیگر srRNAs بر اساس مسیر ترشح مرسوم برای پروتئین‌ها است که در آن siRNAهای ثانویه سنتز شده روی شبکه آندوپلاسمی زیر می‌توانند به داخل وزیکول‌های در حال جوانه زدن داخلی شوند و سپس از طریق ER-Golgi حمل شوند. این srRNAها به صورت srRNAهای آزاد به EHMx آزاد می‌شوند و توسط هاستوریوم از طریق اندوسیتوز جذب می‌شوند.

است به تغییرات مشاهده شده در کارایی خاموش کردن ژن کمک کند. عوامل احتمالی که بر ترشح sRNA تأثیر می‌گذارند عبارت‌اند از توالی‌های sRNA و مسیرهای بیوسنتزی. به‌طور کلی، به نظر می‌رسد siRNAهای ثانویه از طریق مسیر ترشح مستقل از EV در فضای آپوپلاست غنی‌شده باشند. در مقابل، بسیاری از miRNAها به‌طور نسبی در سیتوپلاسم گیاه غنی‌شده‌اند که نشان می‌دهد تمایل کمی برای ترشح به فضای خارج سلولی دارند. اگرچه برخی از miRNAها در EVs یا آپوپلاست غنی‌شده‌اند، اما عامل تعیین‌کننده این انتخاب‌گری همچنان نامشخص است. در سلول‌های حیوانی، نشان داده شده است که موتیف توالی‌های خاص در miRNAهای بالغ، بارگیری انتخابی آن‌ها را در اگزوزوم‌ها توسط پروتئین‌های اتصال‌دهنده RNA (RNA-binding proteins) تعیین می‌کند (Villarroya-Beltri et al. ۲۰۱۳; Hobor et al. ۲۰۱۸). یک پروتئین آرگونوت خارج سلولی (exWAGO) خاص در کرم لوله‌ای گوارشی به‌عنوان محموله EVs شناسایی شده است و پتانسیل بارگیری انتخابی sRNAهایی را دارد که بر ایمنی میزبان تأثیر می‌گذارند (Chow et al. ۲۰۱۹). شناسایی و توصیف پروتئین‌های اتصال‌دهنده sRNA گیاهی که ممکن است ترشح sRNA را از طریق مسیرهای وابسته و مستقل از EV تسهیل کنند، این شکاف مهم دانش در مورد HIGS را پر می‌کند.

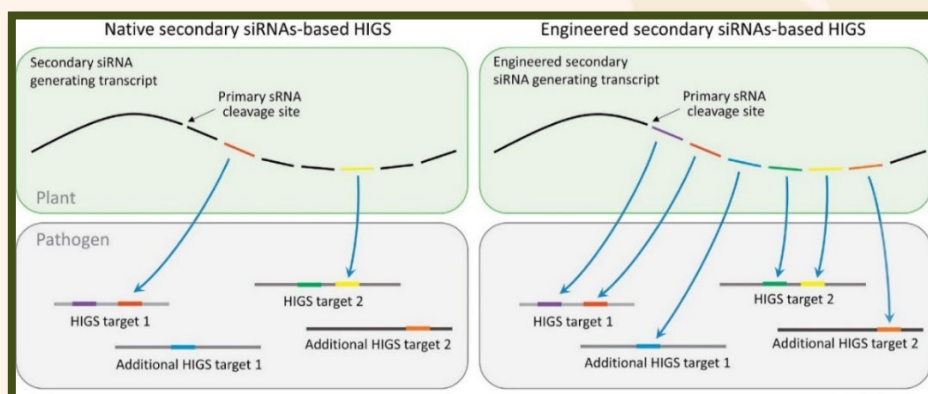
رایج‌ترین روش HIGS ایجاد گیاهان تراریخته‌ای است که حامل قطعه‌ای از DNA بر اساس توالی‌های معنی‌دار (sense) و ضد معنی (antisense) یک ژن هدف انتخاب‌شده هستند (Hua et al. ۲۰۱۸; Rosa et al. ۲۰۱۸).

پس از رونویسی، مولکول‌های RNA دو رشته‌ای بلند یا مولکول‌های سنجاق‌سر بلند تولید می‌شوند که انتظار می‌رود به‌عنوان پیش‌ماده‌هایی برای تولید sRNAهای مصنوعی عمل کنند. اگر این sRNAها در طول آلودگی به سلول‌های عامل بیماری‌زا منتقل شوند، می‌توانند ژن‌های هدف را خاموش کنند. استراتژی دیگر، ایجاد گیاهان تراریخته‌ای است که miRNAهای مصنوعی را با استفاده از بخش اصلی (backbone) یک ژن MIR شناخته‌شده تولید می‌کنند (Rosa et al. ۲۰۱۸). نمونه‌های موفق عمدتاً از ساختارهای سنجاق‌سر بلند گزارش شده‌اند؛ با این حال، تغییرات زیادی در کارایی خاموشی ژن نیز مشاهده شده است (Jahan et al. ۲۰۱۵; Carbonell and Daros ۲۰۱۷). این تغییرات اغلب به‌صورت موردی به نظر می‌رسند و مکانیسم زمینه‌ای آن‌ها ناشناخته است. پژوهش‌های اخیر در زمینه پروفایل sRNA در EVs (وزیکول‌های خارج سلولی) و فضای آپوپلاست، نشان‌دهنده ترشح انتخابی sRNA است که به‌طور اجتناب‌ناپذیری بر کارایی HIGS تأثیر می‌گذارد و ممکن

با این حال تا زمانی که مکانیسم مرتب‌سازی sRNAهای خاص برای ترشح شناسایی نشود، یک رویکرد مبتنی بر siRNA طبیعی نسبت به sRNAهای مصنوعی شانس موفقیت بیشتری خواهد داشت.

شواهد ژنتیکی و تجزیه و تحلیل هدف افکتور عوامل بیماری‌زا، نقش مهمی را برای siRNAهای ثانویه در دفاع گیاه نشان می‌دهند. رویکرد «شلیک گلوله = shotgun» که توسط siRNAهای ثانویه برای هدف قرار دادن چندین ژن عامل بیماری استفاده می‌شود، ممکن است پایداری مقاومت را افزایش دهد. تولید siRNA ثانویه یک عملکرد کاملاً محافظت‌شده در گیاهان خشکی‌زی است (You et al. ۲۰۱۷)؛ بنابراین، فرضیه بر این است که مقاومت با طیف وسیع ممکن است با دست‌کاری مسیر طبیعی siRNA ثانویه به گونه‌ای به دست آید که مجموعه siRNAها برای هدف قرار دادن یک یا چند عامل بیماری خاص بهینه شوند (شکل ۴). به عنوان مثال،

siRNAهای مشتق شده از PPR در آرابتوپسیس توانایی هدف قرار دادن چندین عامل بیماری را دارند؛ و تولید siRNAهای ثانویه از رونوشت‌های PPR هدفمند miRNA در دولپه‌ها از طریق جریان-miRNA-PPR siRNA محافظت‌شده گسترده است (Xia et al. ۲۰۱۳). با استفاده از رویکرد زیست‌شناسی مصنوعی، می‌توان ژن‌های PPR تولیدکننده siRNA ثانویه طبیعی را اصلاح کرد. در این روش، توالی‌های siRNA طبیعی با توالی‌های طراحی‌شده برای هدف‌گیری ژن‌های خاص در یک یا چند عامل بیماری‌زا جایگزین می‌شوند تا کارایی خاموشی افزایش یابد. این استراتژی جایگزینی siRNA ثانویه برای خاموشی ژن *FAD2* در آرابتوپسیس نیز امکان‌پذیر است (Gutierrez-Nava et al. ۲۰۰۸). در ترکیب با فناوری مهندسی مبتنی بر CRISPR/Cas9، این رویکرد نویدبخش تولید محصولات زراعی ویرایش‌تن ژنی با مقاومت بیشتر است.



شکل ۴) رویکرد زیست‌شناسی ترکیبی برای افزایش کارایی خاموشی ژن ناشی از میزبان (HIGS) با مهندسی جایگاه‌های تولید siRNA

ثانویه (Hou and Ma ۲۰۲۰). ناحیه تولید siRNA در یک مولکول RNA با توالی‌هایی جایگزین می‌شود که برای هدف قرار دادن توالی‌های خاص در ژن‌های عامل بیماری‌زا طراحی شده‌اند. محل شکافت اولیه srRNA بدون تغییر باقی می‌ماند تا سنتز پیش‌ساز dsRNA آغاز شود. این پیش‌ساز dsRNA، مجموعه‌ای از siRNAها را تولید می‌کند که ژن‌های هدف را با کارایی بالاتر خاموش می‌کنند. در نتیجه، گیاهان تولیدکننده این siRNAها در برابر عامل بیماری‌زا مقاوم باشند. خطوط بارنگ‌های مختلف نشان‌دهنده توالی‌های siRNA متفاوت یا توالی‌های مکمل آن‌ها در رونوشت‌های هدف هستند.

Spray-induced gene silencing (SIGS) می‌تواند به عنوان ابزاری برای مطالعه مکانیسم‌های HIGS استفاده شود و اطلاعات جدیدی در مورد نحوه عملکرد این روش ارائه دهد.

می‌داد که dsRNAها توسط گیاه جذب شده و در داخل گیاه جابجا می‌شوند. تجزیه و تحلیل dsRNAهای برچسب‌گذاری شده با فلورسنت و آنالیز ژل بلات RNA نشان داد که dsRNA در واقع به‌طور دست‌نخورده حرکت می‌کند و در ابتدا توسط آوندهای چوبی در سطح بریده برگ‌های جدا شده جذب می‌شود، اما سپس به سیمپلاست، از جمله سیتوپلاسم سلول‌های مزوفیل منتقل می‌شود (Koch et al. ۲۰۱۶). مهم‌تر اینکه، خاموشی ژن‌های هدف در قارچی که روی بافت‌های دور (غیر اسپری شده) تلقیح شده بود، به ژن ۱ *DICER-LIKE* قارچ نیاز داشت که به شدت نشان می‌دهد قارچ dsRNAهای بلند را از گیاه جذب کرده است و این dsRNA سپس مکانیسم RNAi را درون قارچ راه‌اندازی کرده است (Koch et al. ۲۰۱۶). قابل ذکر است که نیاز به ژن ۱ *DCL* قارچی را می‌توان با اسپری کردن siRNA به جای dsRNAهای بلند دور زد (Koch et al. ۲۰۱۶) که نشان می‌دهد *F. graminearum* همچنین می‌تواند siRNAها را جذب کند که به احتمال زیاد با

اگرچه خاموشی ژن ناشی از میزبان (HIGS) برای کنترل آفات و بیماری‌های گیاهان زراعی پتانسیل بالایی نشان داده است، اما نگرانی‌های عمومی در مورد ارگانیزم‌های دستکاری شده ژنتیکی (GMOs) و محدودیت‌های انتشار GMOها به محیط زیست، گیاه‌شناسان را به توسعه رویکردهای جدید برای انتقال RNA به عوامل بیماری‌زا ترغیب کرده است. Koch و همکاران (۲۰۱۶) یک روش مؤثر اسپری RNA به نام خاموشی ژن با اسپری (SIGS) *Spray-induced gene silencing* را برای کنترل آلودگی قارچ *F. graminearum* روی جو نشان دادند (شکل ۵). در این مطالعه، یک dsRNA بلند (CYP3-) از جمله سیتوکروم P450 و لانوسترول-14α-دمتیلاز مورد نیاز برای بیوسنتز ارگوسترول قارچی بود. به‌طور غیرمنتظره‌ای، آن‌ها کنترل مؤثر القاشده را در قسمت‌های دور (غیر اسپری شده) برگ‌های جدا شده مشاهده کردند. مشاهده خاموش شدن ژن قارچی در بافت‌های دور نشان

پروتئین‌های AGO قارچی درگیر می‌شوند.

Fusarium circinatum و (Ouyang et al. ۲۰۲۳)

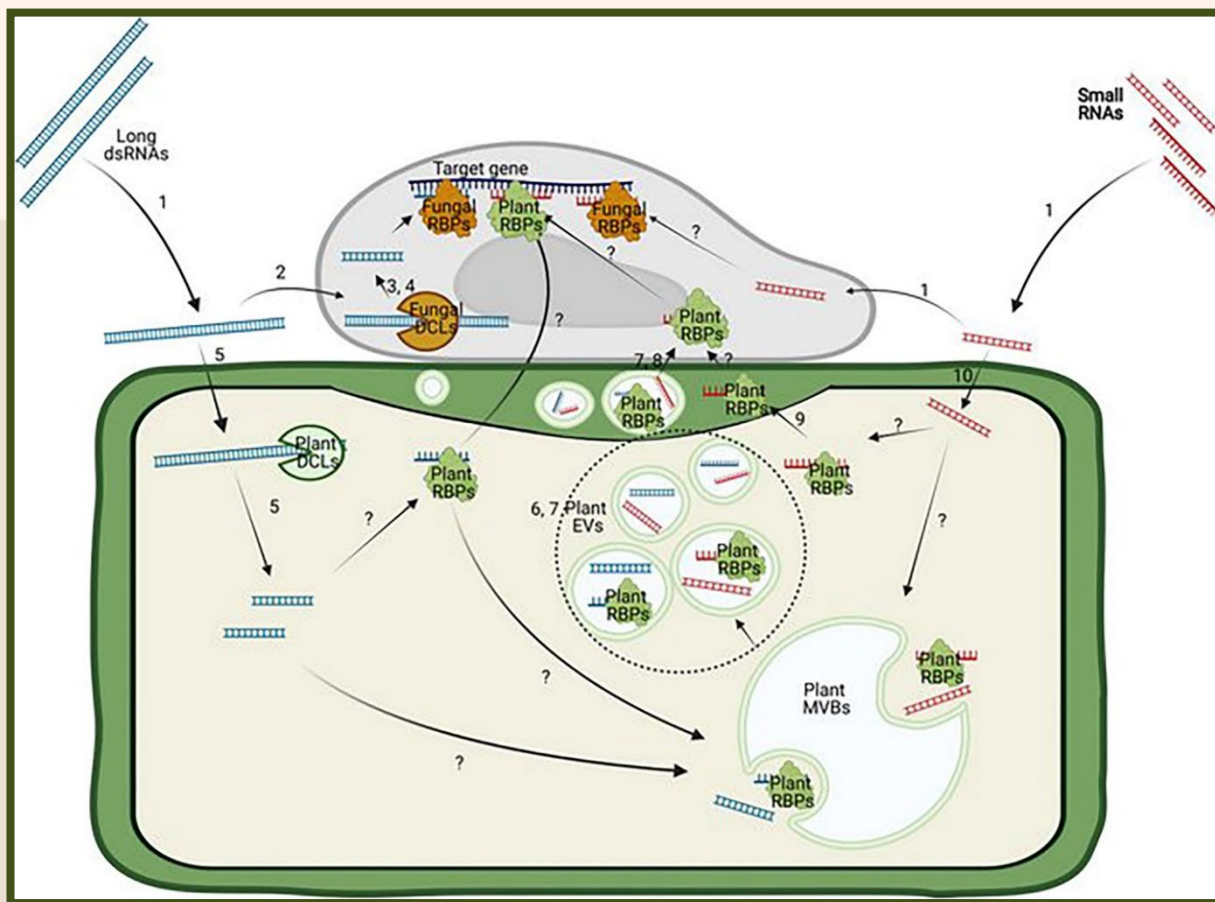
(Bocos-Asenjo et al. ۲۰۲۴) از موجودات قارچ مانند

اوومیس‌ها *Phytophthora infestans*

(Kalyandurg et al. ۲۰۲۱).

این مطالعات بینش‌های بیشتری در مورد چگونگی حرکت *dsRNA* و *siRNA* در داخل برگ‌ها ارائه کرده است. برای مثال Song و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که *dsRNA* اعمال شده روی کولئوپتیل گندم به‌طور مؤثری جذب و به *siRNA*ها پردازش می‌شود. قابل توجه است که استفاده از *dsRNA* به این روش در خاموشی ژن‌های هدف در قارچ *F. asiaticum* کارآمدتر از مخلوط کردن مستقیم *dsRNA*ها در محیط رشد قارچ بلافاصله قبل از تلقیح کولئوپتیل‌های گندم بود. این مشاهده نشان می‌دهد که SIGS از طریق جذب RNA از بافت‌های گیاهی به‌جای جذب مستقیم *dsRNA* از سطح برگ توسط قارچ عمل می‌کند. اگر واقعاً این‌طور باشد، اثربخشی SIGS باید با روش‌هایی که جذب *dsRNA* از سطح برگ به سلول‌های گیاهی را تسهیل می‌کنند، افزایش یابد.

در این تحقیق، فهرستی از مطالعات متعددی را نشان می‌دهد که با استفاده از روش اسپری برای رساندن RNAهای غیر کد کننده (ncRNA) به‌منظور خاموشی ژن (Gene Silencing) در انواع مختلف عوامل بیماری‌زای گیاهی، عمدتاً قارچ‌ها و اوومیس‌ها، متمرکز شد. این مطالعات، اساساً حوزه (SIGS) قرار می‌گیرند که یک استراتژی امیدوارکننده و سازگار با محیط‌زیست برای حفاظت از گیاهان است. در این تحقیقات، تأثیرگذاری روش اسپری ncRNA را علیه طیف گسترده‌ای از بیمارگرهای مهم گیاهی نشان داده‌اند: *F. graminearum* (Koch et al. ۲۰۱۶; Gaffar et al. ۲۰۱۹; Werner et al. ۲۰۲۰) و *Phakopsora pachyrhizi* (Hu et al. ۲۰۲۰) و *Botrytis cinerea* (Wang et al. ۲۰۱۶) و *Sclerotinia sclerotiorum* (McLoughlin et al. ۲۰۱۸) و *Rhizoctonia solani* (Qiao et al. ۲۰۲۱) و *Aspergillus niger* (Qiao et al. ۲۰۲۱) و *Verticillium dahlia* (Song et al. ۲۰۱۸) و *Fusarium culmorum* (Tretiakova et al. ۲۰۲۲) و *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* و



شکل ۵) خلاصه‌ای از یافته‌های کلیدی مرتبط با SIGS (Zand Karimi and Innes ۲۰۲۲). ۱) SIGS می‌تواند توسط هر دو dsRNAs و sRNAs القا شود (Koch *et al.* ۲۰۱۶; Wang *et al.* ۲۰۱۶). ۲) dsRNAهای بلند می‌توانند مستقیماً توسط عوامل بیماری‌زا جذب شده و باعث خاموشی ژن شوند (Koch *et al.* ۲۰۱۶; Wang *et al.* ۲۰۱۶; Hu *et al.* ۲۰۲۰; Qiao *et al.* ۲۰۲۱). ۳) آنزیم‌های DCL در عوامل بیماری‌زا برای القای SIGS توسط dsRNAهای بلند ضروری هستند (Koch *et al.* ۲۰۱۶). ۴) آنزیم‌های DCL در عوامل بیماری‌زا، dsRNAهای بلند را به قطعات کوتاه (sRNA) پردازش می‌کنند (Koch *et al.* ۲۰۱۶). ۵) dsRNAهای بلند اسپری شده می‌توانند توسط سلول‌های گیاهی جذب و توسط آنزیم‌های DCL گیاه پردازش شوند (Biedenkopf *et al.* ۲۰۲۰). ۶) وزیکول‌های خارج سلولی گیاهی (EVs) با sRNAهای تک‌رشته‌ای همراه می‌شوند (Baldrich *et al.* ۲۰۱۹). ۷) وزیکول‌های خارج سلولی گیاهی می‌توانند sRNAها را به سلول‌های عوامل بیماری‌زا منتقل کنند (Cai *et al.* ۲۰۱۸). ۸) پروتئین‌های متصل شونده به RNA (RBPs) گیاهی به sRNAها متصل شده و آن‌ها را به وزیکول‌های خارج سلولی منتقل می‌کنند (He *et al.* ۲۰۲۱). ۹) RBPهای گیاهی به sRNAها متصل شده و آن‌ها را به مایع آپوپلاست (فضای خارج از سلول گیاهی) منتقل می‌کنند (Zand Karimi *et al.* ۲۰۲۲). ۱۰) sRNAهای اسپری شده می‌توانند توسط سلول‌های گیاهی جذب شوند (Dalakouras *et al.* ۲۰۱۶).

*HIGS بخشی از سیستم ایمنی ذاتی گیاهان

است.

متن بالا به این نکته اشاره می‌کند که درحالی‌که مثال‌های قبلی HIGS و SIGS شامل بیان یا استفاده از ساختارهای مصنوعی RNA بوده است، اما شواهد قانع‌کننده‌ای وجود دارد که گیاهان نیز به‌عنوان بخشی از واکنش‌های ایمنی طبیعی خود، siRNAها را از سلول‌های خود به سلول‌های عوامل بیماری‌زا و آفات منتقل می‌کنند. به‌عنوان مثال، Zhang و همکاران (۲۰۱۶a) نشان دادند که گیاهان پنبه زمانی که توسط قارچ *Verticillium dahliae* آلوده می‌شوند، دو miRNA خاص یعنی miR۱۵۹ و miR۱۶۶ را افزایش می‌دهند. این miRNAها توسط قارچ جذب‌شده و در نتیجه باعث خاموشی دو ژن داخلی ضروری برای بیماری‌زایی قارچ می‌شوند. سویه‌های *Verticillium dahliae* که نسخه‌هایی از این ژن‌ها را بیان می‌کنند که در آن‌ها جایگاه هدف miRNA اصلاح‌شده‌اند تا دیگر با miRNAها جفت نشوند، بیماری‌زایی بیشتری را نشان می‌دهند. این موضوع نشان می‌دهد که این miRNAها باهدف قرار دادن ژن‌های قارچی به‌طور مستقیم در ایمنی گیاه نقش دارند.

دومین نمونه از HIGS طبیعی از تحقیقات آزمایشگاه جین ناشی می‌شود که خاموشی ژن‌ها در قارچ *B. cinerea*

توسط siRNAهای خاص آرابیدوپسیس را نشان می‌دهد (Cai et al. ۲۰۱۸; He et al. ۲۰۲۱). محققان پروتوپلاست‌های *B. cinerea* را از برگ‌های آلوده آرابیدوپسیس جدا کرده و آن‌ها را تحت آزمایش توالی یابی siRNA-seq قرار دادند. این آزمایش توالی یابی، وجود تعداد زیادی از siRNAهای گیاهی را در قارچ *B. cinerea* نشان داد. به نظر نمی‌رسد این siRNAهای گیاهی آلودگی باشند، زیرا بسیاری از فراوان‌ترین siRNAهای کشف‌شده در داخل پروتوپلاست‌های *B. cinerea* در بین فراوان‌ترین siRNAهای برگ قرار نداشتند؛ که نشان می‌دهد siRNAهایی که برای انتقال انتخاب‌شده‌اند از نظر توالی اختصاصی هستند. برای تأیید این فرضیه، مشخص شد که این siRNAهای غنی‌شده با EVs جداشده از مایع شستشوی آپوپلاست (AWF) مرتبط هستند (Cai et al. ۲۰۱۸). علاوه بر این، اختلال در مسیر ساخت siRNA با جهش در RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE (RDR۶) حساسیت به *B. cinerea* را افزایش داد که نشان می‌دهد siRNAها نقش مستقیمی در ایمنی گیاه دارند. برای حمایت از این نتیجه‌گیری، ژن‌های هدف پیش‌بینی‌شده این siRNAها در *B. cinerea* در طول آلودگی کاهش یافتند، اما در *B. cinerea* جمع‌آوری‌شده از گیاهان جهش‌یافته *rdr۶* عفونی‌شده، این کاهش دیده نشد (Cai et al. ۲۰۱۸).

یافت، اما در گیاهانی که تولید siRNA در آن‌ها مختل شده بود، این کاهش بیان مشاهده نشد (Hou et al. ۲۰۱۹).

مشاهده اخیر انتقال sRNA از گیاهان انگلی به میزبان‌هایشان (Shahid et al. ۲۰۱۸) احتمالاً با HIGS مرتبط است، اگرچه به‌طور دقیق‌تر این پدیده را می‌توان به‌عنوان خاموشی ژن توسط بیمارگر در نظر گرفت. در این مطالعه، نشان داده شد که چندین mRNA آرابیدوپسیس توسط microRNAهای تولیدشده توسط گیاه انگلی *Cuscuta campestris* هدف قرار می‌گیرند. این microRNAها در طی آلودگی به سلول‌های میزبان منتقل می‌شوند و باعث کاهش تجمع mRNAهای هدف می‌شوند. علاوه بر این، غیرفعال کردن این ژن‌ها، آرابیدوپسیس را نسبت به شاهد به‌طور قابل‌توجهی در برابر *C. campestris* آسیب‌پذیرتر کرد که نشان می‌دهد microRNAهای *C. campestris* با خاموشی ژن‌های هدف در میزبان، نقش اساسی در انگلی بودن ایفا می‌کنند.

سومین نمونه از HIGS که شامل sRNAهای داخلی است، Hou و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که آلوده کردن آرابیدوپسیس با عامل بیماری‌زای اوومیسیت *Phytophthora capsici* باعث تولید مجموعه‌ای متنوع از siRNAها می‌شود که حداقل برخی از آن‌ها به فضای خارج سلولی ترشح می‌شوند. نکته مهم این است که اختلال در مسیر ساخت siRNA، گیاه آرابیدوپسیس را نسبت به آلودگی با *P. capsici* بسیار حساس می‌کند. همچنین، بیان تراریخته (transgenic expression) siRNAهای خاصی در خود این عامل بیماری‌زا، خاصیت بیماری‌زایی آن را مهار می‌کند که نشان می‌دهد siRNAهای ترشح‌شده مستقیماً به ایمنی گیاه کمک می‌کنند.

در راستای این دیدگاه، یک ژن هدف بالقوه در *P. capsici* برای یکی از siRNA خاص، طی آلودگی در گیاهان نوع وحشی (wild-type) کاهش بیان (downregulated)

*نتیجه گیری

توالی در طول فرگشت توأم با ژن‌های هدف عامل بیماری، آن‌ها را به‌عنوان عوامل ضد میکروبی بسیار مناسب می‌کند. باین‌حال، یک سؤال مهم و بی‌پاسخ، فرآیند جداسازی و ترشح srRNAها است که ممکن است توسط مسیرهای وابسته به وزیکول‌های خارج سلولی (EV) یا مستقل از آن‌ها تعیین شود و همچنین می‌تواند با تکامل siRNA همراه باشد. باوجوداین، یافته‌های اخیر فرصت‌های جدید هیجان‌انگیزی را برای توسعه مقاومت در برابر بیماری در محصولات کشاورزی از طریق مهندسی دفاع مبتنی بر srRNA طبیعی ارائه می‌دهد.

حوزه تحقیقاتی تعاملات میزبان و بیمارگر شاهد پیشرفت‌های چشمگیری در رقابت تسلیحاتی (arms race) بوده که حول محور خاموشی RNA کوچک فراگونه‌ای (trans-species srRNA silencing) متمرکز است. در گیاهان، نشان داده شده است که هر دو نوع miRNA و siRNA از طریق مکانیسم HIGS به‌عنوان عوامل ضد میکروبی عمل می‌کنند. باین‌حال، ویژگی‌های منحصر به فرد siRNAهای ثانویه، به‌ویژه پتانسیل تنوع

*منابع

1. Alonso-Peral, M. M., Li, J., Li, Y., Allen, R. S., Schnippenkoetter, W., Ohms, S., ... & Millar, A. A. (2010). The microRNA159-regulated GAMYB-like genes inhibit growth and promote programmed cell death in Arabidopsis. *Plant physiology*, 154(2), 757-771.
2. Baldrich, P., Rutter, B. D., Karimi, H. Z., Podicheti, R., Meyers, B. C., & Innes, R. W. (2019). Plant extracellular vesicles contain diverse small RNA species and are enriched in 10-to 17-nucleotide "tiny" RNAs. *The Plant Cell*, 31(2), 315-324.
3. Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, 431(7006), 356-363.
4. Bocos-Asenjo, I. T., Amin, H., Mosquera, S., Díez-Hernando, S., Ginesy, M., Díez, J. J., & Niño-Sánchez, J. (2024). Spray-induced gene silencing (SIGS) as a tool for the management of Pine Pitch Canker forest disease. *bioRxiv*, 2024-03.
5. Cai, Q., Liang, C., Wang, S., Hou, Y., Gao, L., Liu, L., ... & Chen, X. (2018). The disease resistance protein SNC1 represses the biogenesis of microRNAs and phased siRNAs. *Nature communications*, 9(1), 5080.
6. Cai, Q., Qiao, L., Wang, M., He, B., Lin, F. M., Palmquist, J., ... & Jin, H. (2018). Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science*, 360(6393), 1126-1129.

7. Canto-Pastor, A., Santos, B. A., Valli, A. A., Summers, W., Schornack, S., & Baulcombe, D. C. (2019). Enhanced resistance to bacterial and oomycete pathogens by short tandem target mimic RNAs in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(7), 2755-2760.
8. Cao, M., Du, P., Wang, X., Yu, Y. Q., Qiu, Y. H., Li, W., ... & Ding, S. W. (2014). Virus infection triggers widespread silencing of host genes by a distinct class of endogenous siRNAs in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(40), 14613-14618.
9. Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642-655.
10. Casadevall, A., Nosanchuk, J. D., Williamson, P., & Rodrigues, M. L. (2009). Vesicular transport across the fungal cell wall. *Trends in microbiology*, 17(4), 158-162.
11. Chen, X. (2009). Small RNAs and their roles in plant development. *Annual Review of Cell and Developmental*, 25, 21-44.
12. Chow, F. W. N., Koutsovoulos, G., Ovando-Vázquez, C., Neophytou, K., Bermudez-Barrientos, J. R., Laetsch, D. R., ... & Buck, A. H. (2019). Secretion of an Argonaute protein by a parasitic nematode and the evolution of its siRNA guides. *Nucleic Acids Research*, 47(7), 3594-3606.
13. Cogoni, C., & Macino, G. (1997). Isolation of quelling-defective (qde) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(19), 10233-10238.
14. Cogoni, C., & Macino, G. (1999). Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature*, 399(6732), 166-169.
15. Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology*, 30, 255-289.
16. Dahan, J., & Mireau, H. (2013). The Rf and Rf-like PPR in higher plants, a fast-evolving subclass of PPR genes. *RNA biology*, 10(9), 1469-1476.
17. Ding, Y., Robinson, D. G., & Jiang, L. (2014). Unconventional protein secretion (UPS) pathways in plants. *Current Opinion in Cell Biology*, 29, 107-115.
18. Ellendorff, U., Fradin, E. F., De Jonge, R., & Thomma, B. P. (2009). RNA silencing is required for Arabidopsis defence against *Verticillium* wilt disease. *Journal of experimental botany*, 60(2), 591-602.
19. Fagard, M., Boutet, S., Morel, J. B., Bellini, C., & Vaucheret, H. (2000). AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(21), 11650-11654.
20. Fujii, S., Bond, C. S., & Small, I. D. (2011). Selection patterns on restorer-like genes reveal a conflict between nuclear and mitochondrial genomes throughout angiosperm evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(4), 1723-1728.

21. Gaffar, F. Y., Imani, J., Karlovsky, P., Koch, A., & Kogel, K. H. (2019). Different components of the RNA interference machinery are required for conidiation, ascosporeogenesis, virulence, deoxynivalenol production, and fungal inhibition by exogenous double-stranded RNA in the head blight pathogen *Fusarium graminearum*. *Frontiers in microbiology*, 10, 437152.
22. Ghag, S. B., Shekhawat, U. K., & Ganapathi, T. R. (2014). Host-induced post-transcriptional hairpin RNA-mediated gene silencing of vital fungal genes confers efficient resistance against *Fusarium wilt* in banana. *Plant biotechnology journal*, 12(5), 541-553.
23. Gonsalves, D. (1998). Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. *Annual review of phytopathology*, 36(1), 415-437.
24. Govindarajulu, M., Epstein, L., Wroblewski, T., & Michelmore, R. W. (2015). Host-induced gene silencing inhibits the biotrophic pathogen causing downy mildew of lettuce. *Plant biotechnology journal*, 13(7), 875-883.
25. Guo, Z., Li, Y., & Ding, S. W. (2019). Small RNA-based antimicrobial immunity. *Nature Reviews Immunology*, 19(1), 31-44.
26. Hartig, J. V., Tomari, Y., & Förstemann, K. (2007). piRNAs—the ancient hunters of genome invaders. *Genes & development*, 21(14), 1707-1713.
27. He, B., Cai, Q., Qiao, L., Huang, C. Y., Wang, S., Miao, W., ... & Jin, H. (2021). RNA-binding proteins contribute to small RNA loading in plant extracellular vesicles. *Nature plants*, 7(3), 342-352.
28. Hou, Y., Zhai, Y. I., Feng, L. I., Karimi, H. Z., Rutter, B. D., Zeng, L., ... & Ma, W. (2019). A *Phytophthora* effector suppresses trans-kingdom RNAi to promote disease susceptibility. *Cell host & microbe*, 25(1), 153-165.
29. Hu, D., Chen, Z. Y., Zhang, C., & Ganiger, M. (2020). Reduction of *Phakopsora pachyrhizi* infection on soybean through host-and spray-induced gene silencing. *Molecular plant pathology*, 21(6), 794-807.
30. Hua, C., Zhao, J. H., & Guo, H. S. (2018). Trans-kingdom RNA silencing in plant–fungal pathogen interactions. *Molecular plant*, 11(2), 235-244.
31. Huang, G., Allen, R., Davis, E. L., Baum, T. J., & Hussey, R. S. (2006). Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(39), 14302-14306.
32. Huot, B., Yao, J., Montgomery, B. L., & He, S. Y. (2014). Growth–defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. *Molecular plant*, 7(8), 1267-1287.
33. Jahan, S. N., Åsman, A. K., Corcoran, P., Fogelqvist, J., Vetukuri, R. R., & Dixelius, C. (2015). Plant-mediated gene silencing restricts growth of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *Journal of experimental botany*, 66(9), 2785-2794.
34. Kalyandurg, P. B., Sundararajan, P., Dubey, M., Ghadamgahi, F., Zahid, M. A., Whisson, S. C., & Vetukuri, R. R. (2021). Spray-induced gene silencing as a potential tool to control potato late blight disease. *Phytopathology®*, 111(12), 2168-2175.

35. Katahira, J., & Yoneda, Y. (2011). Nucleocytoplasmic transport of microRNAs and related small RNAs. *Traffic*, 12(11), 1468-1474.
36. Katiyar-Agarwal, S., & Jin, H. (2010). Role of small RNAs in host-microbe interactions. *Annual review of phytopathology*, 48, 225-246.
37. Kim, G., LeBlanc, M. L., Wafula, E. K., DePamphilis, C. W., & Westwood, J. H. (2014). Genomic-scale exchange of mRNA between a parasitic plant and its hosts. *Science*, 345(6198), 808-811.
38. Kim, V. N. (2004). MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends in cell biology*, 14(4), 156-159.
39. Koch, A., Kumar, N., Weber, L., Keller, H., Imani, J., & Kogel, K. H. (2013). Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 α -demethylase-encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(48), 19324-19329.
40. Kong, L., Shi, X., Chen, D., Yang, N., Yin, C., Yang, J., ... & Liu, S. (2022). Host-induced silencing of a nematode chitin synthase gene enhances resistance of soybeans to both pathogenic *Heterodera glycines* and *Fusarium oxysporum*. *Plant Biotechnology Journal*, 20(5), 809.
41. Lee, H. C., Li, L., Gu, W., Xue, Z., Crosthwaite, S. K., Pertsemlidis, A., ... & Liu, Y. (2010). Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi. *Molecular cell*, 38(6), 803-814.
42. Li, F., Pignatta, D., Bendix, C., Brunkard, J. O., Cohn, M. M., Tung, J., ... & Baker, B. (2012). MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(5), 1790-1795.
43. Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., & Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *science*, 303(5654), 95-98.
44. Martínez de Alba, A. E., Moreno, A. B., Gabriel, M., Mallory, A. C., Christ, A., Bounon, R., ... & Maizel, A. (2015). In plants, decapping prevents RDR6-dependent production of small interfering RNAs from endogenous mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 43(5), 2902-2913.
45. McLoughlin, A. G., Walker, P. L., Wytinck, N., Sullivan, D. S., Whyard, S., & Belmonte, M. F. (2018). Developing new RNA interference technologies to control fungal pathogens. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 40(3), 325-335.
46. Melnyk, C. W., Molnar, A., & Baulcombe, D. C. (2011). Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *The EMBO journal*, 30(17), 3553-3563.
47. Miyoshi, K., Miyoshi, T., & Siomi, H. (2010). Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. *Molecular Genetics and Genomics*, 284, 95-103.
48. Nicolas, F. E., Moxon, S., de Haro, J. P., Calo, S., Grigoriev, I. V., Torres-Martínez, S., ... & Dalmay, T. (2010). Endogenous short RNAs generated by Dicer 2 and RNA-dependent RNA polymerase 1 regulate mRNAs in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Nucleic acids research*, 38(16), 5535-5541.

49. Nunes, C. C., Gowda, M., Sailsbery, J., Xue, M., Chen, F., Brown, D. E., ... & Dean, R. A. (2011). Diverse and tissue-enriched small RNAs in the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe oryzae*. *BMC genomics*, 12, 1-20.
50. Ouyang, S. Q., Ji, H. M., Feng, T., Luo, S. J., Cheng, L., & Wang, N. (2023). Artificial trans-kingdom RNAi of *FolRDR1* is a potential strategy to control tomato wilt disease. *Plos Pathogens*, 19(6), e1011463.
51. Parry, G., Calderon-Villalobos, L. I., Prigge, M., Peret, B., Dharmasiri, S., Itoh, H., ... & Estelle, M. (2009). Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(52), 22540-22545.
52. Qiao, Y., Liu, L., Xiong, Q., Flores, C., Wong, J., Shi, J., ... & Ma, W. (2013). Oomycete pathogens encode RNA silencing suppressors. *Nature genetics*, 45(3), 330-333.
53. Qiao, Y., Shi, J., Zhai, Y., Hou, Y., & Ma, W. (2015). Phytophthora effector targets a novel component of small RNA pathway in plants to promote infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5850-5855.
54. Raruang, Y., Omolehin, O., Hu, D., Wei, Q., Han, Z. Q., Rajasekaran, K., ... & Chen, Z. Y. (2020). Host induced gene silencing targeting *Aspergillus flavus* aflM reduced aflatoxin contamination in transgenic maize under field conditions. *Frontiers in microbiology*, 11, 754.
55. Romano, N., & Macino, G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular microbiology*, 6(22), 3343-3353.
56. Rosa, C., Kuo, Y. W., Wuriyanghan, H., & Falk, B. W. (2018). RNA interference mechanisms and applications in plant pathology. *Annual review of phytopathology*, 56, 581-610.
57. Rutter, B. D., & Innes, R. W. (2017). Extracellular vesicles isolated from the leaf apoplast carry stress-response proteins. *Plant physiology*, 173(1), 728-741.
58. Sanford, J. C., & Johnston, S. A. (1985). The concept of parasite-derived resistance—Deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology*, 113(2), 395-405.
59. Sato, F., Tsuchiya, S., Meltzer, S. J., & Shimizu, K. (2011). MicroRNAs and epigenetics. *The FEBS journal*, 278(10), 1598-1609.
60. Shahid, S., Kim, G., Johnson, N. R., Wafula, E., Wang, F., Coruh, C., ... & Axtell, M. J. (2018). MicroRNAs from the parasitic plant *Cuscuta campestris* target host messenger RNAs. *Nature*, 553(7686), 82-85.
61. Song, X. S., Gu, K. X., Duan, X. X., Xiao, X. M., Hou, Y. P., Duan, Y. B., ... & Zhou, M. G. (2018). Secondary amplification of siRNA machinery limits the application of spray-induced gene silencing. *Molecular plant pathology*, 19(12), 2543-2560.
62. Tinoco, M. L. P., Dias, B. B., Dall'Asta, R. C., Pamphile, J. A., & Aragão, F. J. (2010). In vivo trans-specific gene silencing in fungal cells by in planta expression of a double-stranded RNA. *BMC biology*, 8, 1-11.

63. Tomilov, A. A., Tomilova, N. B., Wroblewski, T., Micheltore, R., & Yoder, J. I. (2008). Trans-specific gene silencing between host and parasitic plants. *The Plant Journal*, 56(3), 389-397.
64. Tretiakova, P., Voegelé, R. T., Soloviev, A., & Link, T. I. (2022). Successful silencing of the mycotoxin synthesis gene TRI5 in *Fusarium culmorum* and observation of reduced virulence in VIGS and SIGS experiments. *Genes*, 13(3), 395.
65. Turner, C. T., Davy, M. W., MacDiarmid, R. M., Plummer, K. M., Birch, N. P., & Newcomb, R. D. (2006). RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect molecular biology*, 15(3), 383-391.
66. Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*, 9(6), 654-659.
67. Wang, M., Weiberg, A., Lin, F. M., Thomma, B. P., Huang, H. D., & Jin, H. (2016). Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature plants*, 2(10), 1-10.
68. Wang, S., Boevink, P. C., Welsh, L., Zhang, R., Whisson, S. C., & Birch, P. R. (2017). Delivery of cytoplasmic and apoplastic effectors from *Phytophthora infestans* haustoria by distinct secretion pathways. *New phytologist*, 216(1), 205-215.
69. Westwood, J. H., Roney, J. K., Khatibi, P. A., & Stromberg, V. K. (2009). RNA translocation between parasitic plants and their hosts. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 65(5), 533-539.
70. Xia, R., Meyers, B. C., Liu, Z., Beers, E. P., Ye, S., & Liu, Z. (2013). MicroRNA superfamilies descended from miR390 and their roles in secondary small interfering RNA biogenesis in eudicots. *The Plant Cell*, 25(5), 1555-1572.
71. Xiong, Q., Ye, W., Choi, D., Wong, J., Qiao, Y., Tao, K., ... & Ma, W. (2014). Phytophthora suppressor of RNA silencing 2 is a conserved RxLR effector that promotes infection in soybean and *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(12), 1379-1389.
72. Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R. M., Andreu, Z., Bedina Zavec, A., Borràs, F. E., Buzas, E. I., ... & De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles*, 4(1), 27066.
73. Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*, 17(24), 3011-3016.
74. Yin, C., Ramachandran, S. R., Zhai, Y., Bu, C., Pappu, H. R., & Hulbert, S. H. (2019). A novel fungal effector from *Puccinia graminis* suppressing RNA silencing and plant defense responses. *New Phytologist*, 222(3), 1561-1572.
75. You, C., Cui, J., Wang, H., Qi, X., Kuo, L. Y., Ma, H., ... & Chen, X. (2017). Conservation and divergence of small RNA pathways and microRNAs in land plants. *Genome biology*, 18, 1-19.
76. Yu, Y., Jia, T., & Chen, X. (2017). The 'how' and 'where' of plant micro RNA s. *New Phytologist*, 216(4), 1002-1017.

- 
77. Zand Karimi, H., & Innes, R. W. (2022). Molecular mechanisms underlying host-induced gene silencing. *The Plant Cell*, 34(9), 3183-3199.
78. Zhang, T., Zhao, Y. L., Zhao, J. H., Wang, S., Jin, Y., Chen, Z. Q., ... & Guo, H. S. (2016). Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen. *Nature plants*, 2(10), 1-6.
79. Zhang, W., Corwin, J. A., Copeland, D. H., Feusier, J., Eshbaugh, R., Cook, D. E., ... & Kliebenstein, D. J. (2019). Plant–necrotroph co-transcriptome networks illuminate a metabolic battlefield. *elife*, 8, e44279.
- 

Host-induced gene silencing (HIGS)

Rana Nurmahammadi

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

rana.nurmahammadi1993@gmail.com

<https://doi.org/10.22059/giahpzshsj.2025.408001.1029>

*Abstract

Host-induced gene silencing (HIGS) is a process in which host plant cells can suppress the expression of genes in pathogens such as viruses, bacteria, fungi, or pests. HIGS is a type of RNA interference (RNAi) used by eukaryotic cells to regulate gene expression and defend against pathogens. Plant pathogenic fungi are a major threat to global food security and represent one of the largest groups of crop pathogens. Therefore, HIGS has attracted attention due to its potential applications in crop protection and disease management. Understanding the fundamental mechanisms of HIGS is essential to fully exploit its potential and develop effective applications in agriculture and biotechnology. In this study, we discuss the definition of HIGS, key aspects of RNA silencing mechanisms, strategies for using RNA silencing to study fungal pathogenicity, and the development of fungal resistance through expression of silencing constructs in host plants as a powerful disease control strategy. We also highlight recent findings on the use of HIGS as a tool for engineering disease resistance and describe the SIGS method as an approach to study HIGS mechanisms.

Keywords: Host-induced gene silencing (HIGS); RNA interference (RNAi); Fungal pathogens; Plant resistance; Disease control