

专论与综述

Reviews

RNA 沉默转基因技术在植物抗病虫研究中的作用

杨美玲, 李琦, 陈佳琦, 张晓明*

(中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 RNA 沉默技术由于其简便、高效及高特异性在各种模式和非模式生物系统中得到了广泛的应用。植物转基因技术是将植物、动物或微生物中分离到的目的基因, 通过各种手段整合到植物基因组上, 使其稳定遗传并赋予植物新的优良性状的生物技术。RNA 沉默在植物转基因工程领域的研究十分广泛, 目前已经成功研究培育出许多抗病毒、抗虫转基因植物, 为农业病虫害的防控提供了新的思路和方法。本文重点综述了近年来植物转基因介导 RNA 沉默在抗虫与抗病毒研究方面的进展, 加深人们对转基因植物抗虫与抗病毒研究的认识。

关键词 RNA 沉默; 转基因技术; 植物抗虫; 植物抗病毒

中图分类号: S 43, Q 943.2 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019234

The plant resistances to viruses and pests mediated by transgenic RNA silencing technology

YANG Meiling, LI Qi, CHEN Jiaqi, ZHANG Xiaoming*

(State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract RNA silencing, a powerful technique that permits tissue-specific, simple and efficient gene knockdown, has been widely applied in model and non-model organisms. With transgenic technology, recombinant DNA fragments from plants, animals, or microbes are transformed into plants to generate transgenic plants with better characteristics. RNA silencing has been widely used to create transgenic plants that show higher resistance to viruses or pests relative to non-transformed ones. In this paper, we reviewed the recent advancements in the functions of transgenic RNA silencing in plant resistances to viruses and pests. It will improve our understanding of the function of transgenic technology in plant resistances to viruses and pests.

Key words RNA silencing; transgenic technology; plant resistance to pests; plant resistance to viruses

中国是一个农业生物灾害频发、生态环境脆弱的农业大国。毁灭性的农作物病虫害频繁暴发, 导致农业经济损失与环境破坏。因此, 安全有效地防治农作物病虫害是提高农业生产安全、保障农产品质量、减少环境污染、保护人类健康和促进农业可持续发展的重要组成部分。

RNA 沉默(RNA silencing)是真核生物内广泛存在的调控机制, 小分子 RNA (small RNA, sRNA) 通过与靶标基因的配对在转录水平和转录后水平调控基因的表达。体外合成一段与内源基因同源的双

链 RNA (double-strand RNA, dsRNA) 或 sRNA, 将其导入生物体内, 可以使内源基因中同源 mRNA 降解, 从而达到抑制基因表达的目的, 这种现象是 RNA 沉默现象的一种, 被称为共抑制 (co-suppression)^[1]。利用相似的机制克隆昆虫或者病毒靶标片段, 构建 dsRNA 转入植物, 也可以沉默昆虫或病毒基因, 这种方法是防治植物病虫害的有效途径之一。采用转基因 RNA 沉默技术进行病虫害控制是植物保护领域的一种新型策略, 该技术具有如下特点: 1) 对靶标生物具有专一性, 对非靶标生物无

收稿日期: 2019-05-07 修订日期: 2019-06-25

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项 (2016ZX08010001); 国家重点研发计划 (2017YFD0200406, 2017YFD0200904); 国家自然科学基金 (31872302, 32070505); 北京市自然科学基金 (6192021)

* 通信作者 E-mail: zhangxm@ioz.ac.cn

杀伤作用;2)RNA在自然界易降解,残留低;3)对环境无毒无害,相对安全。人们将基于RNA沉默的害虫控制称为“第四代杀虫剂”^[2-3]。目前,这种技术已经广泛应用于多种动植物的功能基因组研究和代谢途径分析,并且在植物的抗病虫育种中表现出了巨大的优势,成为植物抗病虫基因工程的热点。

1 RNA沉默的发生机制

1998年Fire等首次发现dsRNA是RNA沉默现象的诱发因子,并将抑制序列同源性基因表达的现象定义为RNA干扰^[4]。RNA干扰(RNA interference, RNAi)是指在动物系统内将dsRNA导入细胞,在细胞内特异性地诱导与之同源互补的mRNA的降解或者抑制其蛋白质翻译,使相应基因不能表达的现象^[5]。植物体内的这类相似现象被称为共抑制或者基因沉默(gene silencing),根据其作用方式的差异又可分为转录水平基因沉默(transcriptional gene silencing, TGS)和转录后水平基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)。现在研究人员将真核生物的这一类现象统称为RNA沉默。

RNA沉默是非常保守的基因表达调控机制,该机制由dsRNA诱导发生,外源或内源dsRNA在一种RNase III类似核酸酶Dicer/DCL的酶切作用下,剪切生成长度为21~24 nt的双链小RNA。然后双链sRNA与以Argonaute(AGO)蛋白为主体的蛋白复合体结合形成RNA诱导的沉默复合体(RNA induced silencing complex, RISC)^[6-7]。RISC中的一条sRNA通过碱基配对可以与mRNA结合,引导AGO识别mRNA通过降解或者抑制翻译的方式抑制基因表达,造成转录后水平的基因沉默;RISC复合体中的sRNA也可以通过碱基配对的方式与相应DNA结合,通过DNA甲基化的方式抑制基因转录,造成转录水平的基因沉默^[8]。RNA沉默的作用表现在抵御病毒、转座子等外来核酸入侵,识别并抑制外源基因表达,维持生物体基因组完整性等方面^[9-11]。在植物转基因过程中,转入基因与内源基因具有很高同源性,更重要的是转基因过程中经常会有多拷贝基因转入,这两种现象都会高效引发基因沉默,这种现象被称为转基因沉默。

对于RNAi介导的转基因抗性植物而言,RNA沉默靶标基因的选择不仅要筛选对病虫害发育有重要影响的基因,而且还要保证这些基因不会对天敌、哺乳动物和人等非靶标生物产生不良影响。只有通过上述研究才能利用RNAi在大田应用。如果想同时研究同一家族几个基因的功能,则在这些基因的保守域设计dsRNA即可同时沉默多个基因以达到研究目的^[12]。

为了降低RNA沉默的脱靶效应,siRNA序列的选择有一定标准,siRNA序列有21个核苷酸,其中19个核苷酸形成双螺旋结构,同时在3'端有2个突出的碱基形成悬垂结构,例如AA或UU;通常siRNA的GC含量在30%~70%之间;而且目标siRNA序列不能距离起始密码子太近等^[13]。目前一些设计siRNA的软件和一些生物公司提供的在线设计siRNA的程序也基本考虑了上述标准。有研究人员发现对同一个靶基因的不同位点设计4条不同的siRNA,将这4条siRNA按照特定比例混合可高效沉默靶标基因,分析发现混合的siRNA与单一转染的siRNA相比可显著降低脱靶效应^[14]。

2 植物RNA沉默转基因技术在害虫控制中的应用

将RNA沉默转基因植物饲喂昆虫可以有效沉默靶基因的表达^[15]。利用植物转基因表达dsRNA进行害虫防治已成为新型的植物保护策略^[16-17]。Pitino等在拟南芥内转化表达桃蚜*Myzus persicae* *MpC002*和*Rack-1*基因的dsRNA,采用Northern杂交技术检测转基因拟南芥中目标sRNA的表达,结果表明转基因植物中有大量目标基因*MpC002*和*Rack-1*的sRNA积累^[18],随后发现桃蚜取食转基因拟南芥和烟草后,沉默了昆虫体内的*MpC002*和*MpPIntO2*基因,使其在转基因植物上繁殖的后代显著减少^[19-20]。Mao等在烟草中转化表达gap gene *hunchback(hb)*的dsRNA,增强了烟草对桃蚜的耐受性^[21]。Kumar等构建了表达烟草天蛾*Manduca sexta*细胞色素P450基因*CYP6B46* dsRNA的病毒载体,转化烟草进行Northern杂交分析,侵染烟草内有大量*CYP6B46* sRNA积累^[22]。随后研究发现*CYP6B46* RNA沉默转基因烟草确实能够有效沉默鳞翅目昆虫

内相关基因^[23-24]。但是这些研究大多在模式植物拟南芥和烟草中完成^[18,25-26]。

有研究表明在玉米、水稻和棉花等农作物中表达 dsRNA,也可以很好地提高作物对害虫的抗性^[27-29]。2007 年,陈晓亚课题组在棉花中成功转化表达棉铃虫 P450 基因 *CYP6AE14* 的 dsRNA,高效沉默取食植物的棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 体内的靶基因,保护棉花免受棉铃虫危害^[25,29]。美国孟山都公司在玉米内转化表达 *V-ATPase A* 的 dsRNA,能够有效抵抗玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* 的危害^[27],随后又在提高 RNA 干扰效率方面做了大量研究工作^[30],并尝试采用田间喷洒和各种载体表达 dsRNA 的方法进行害虫控制。Zha 等构建获得了表达褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 中肠基因 *NIHT1*、*Nlcar* 和 *Nltry* 的 dsRNA 的转基因水稻,Northern 杂交检测转基因水稻中 dsRNA 的表达情况,结果表明所获得的转基因水稻叶片和韧皮部汁液中,靶基因 RNA 部分以 dsRNA 形式存在,部分以 sRNA 形式存在,褐飞虱取食该转基因水稻后,中肠中的 *NIHT1*、*Nlcar* 和 *Nltry* 基因表达被高效抑制,但是褐飞虱无致死表现出现^[28]。

转基因 RNAi 技术有诸多优点,不需要对靶标全长基因进行克隆,只需要几十至几百个碱基片段,大大简化了基因克隆步骤,有利于利用转基因技术进行害虫控制。尽管关于运用转基因 RNAi 进行害虫防治已经有 20 多年的研究,但相关的应用与研究还处于初级阶段,仍有很多关键问题亟待解决和突破。例如,实验室取得的防治效果能不能应用于田间实际操作中?如何提高 dsRNA 的沉默效果?如何使用特定的 RNAi 来保护植物免受害虫的为害,但又不伤害以这些植物为食的其他物种?利用转基因植物表达的 dsRNA 是否会对寄主植物本身产生影响,且能在多少个子代中稳定地遗传?如何推迟害虫对 RNAi 的适应性等。这一系列基础性和技术性的问题都需进一步深入研究。

3 植物 RNA 沉默转基因技术在植物病害控制中的应用

RNA 沉默参与植物的抗病原菌反应,从感病棉花中分离的大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* 中,检测到很多来源于棉花的内源小 RNA(miRNAs),并调控

真菌靶基因的下调,证明棉花能够传输 siRNA 到真菌细胞中诱导目标基因的沉默^[31]。AGO2 可以通过结合 miR393b* 来抑制 *MEMB12* 基因的翻译。*MEMB12* 基因的表达受到抑制引起 *PR1*(pathogenesis-related protein 1)基因表达的上调,最终提高了植物对细菌的抗性^[7]。寄主植物的 miRNAs 的表达也受到很多病原菌的诱导或抑制,比如灰霉病菌 *Botrytis cinerea*^[32]、白粉菌 *Erysiphe graminis*^[33]、镰刀菌 *Fusarium virguliforme*^[34] 以及稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae*^[35] 等。这些结果表明,RNA 沉默在植物对病原菌的抗病调控中扮演着重要角色。

RNA 沉默也是植物内重要的抗病毒机制^[36-39]。将某种病毒的某一序列片段设计成双链结构,导入植物体内,使之表达可诱发 RNA 沉默的 dsRNA,通过诱发的 RNA 沉默强化植物体内天然的 RNA 沉默抗病毒机制,就可获得具有很高抗病毒特性的转基因植物^[40-42]。这种 RNA 沉默转基因技术已成为植物抗病毒基因工程的重要策略。同时由于病毒侵染的过程中会积累大量的 dsRNA,导致 RNA 沉默的高效发生,研究人员利用这种机制将寄主植物的相应基因片段克隆到病毒载体上,利用病毒的侵染高效沉默宿主基因,研究目标基因的功能,人们称这种技术为病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)^[43-45]。

将单个病毒的特定基因片段构建 dsRNA 载体,转基因后可获得对这一病毒具有抗性的植物。Waterhouse 等以 *HC-Pro* 为目的基因,利用自行折回形成 dsRNA 的载体获得转基因烟草,有效地应对马铃薯 Y 病毒 *Potato virus Y* (PVY) 的入侵^[46]。2011 年,人们又在烟草内分别转入黄瓜花叶病毒 *Cucumber mosaic virus* (CMV) 复制酶基因和烟草花叶病毒 *Tobacco mosaic virus* (TMV) 运动蛋白基因的反向重复序列,检测到 CMV 复制酶基因和 TMV 运动蛋白基因 sRNA 的积累,并获得了抗 CMV 和 TMV 病毒的转基因烟草^[47]。Wang 等将大麦黄矮病毒 *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) 的复制酶基因片段构建到可产生发夹结构的载体,转化大麦获得了可稳定遗传的抗病毒转化系^[48]。

同样利用 RNA 沉默机制还可以培育广谱抗性的转基因作物。番茄斑萎病毒 *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)、番茄褪绿斑病毒 *Tomato chlorosis*

spot virus(TCSV)、花生环斑病毒 Groundnut ring spot virus(GRSV)和西瓜银色斑驳病毒 Watermelon silver mottle virus(WSMoV)为番茄斑萎病毒属中的 4 种病毒, Bucher 等构建了同时含有这 4 种病毒的 N 基因序列的反向重复片段, 转化本氏烟后能特异性的检测到 4 种病毒的 sRNA, 获得了能同时抵御这 4 种病毒的转基因植株, 这说明转基因烟草同时对这 4 种病毒发生了 RNA 沉默^[49]。

类病毒是一种只有 246~401 nt 的单链环状 RNA 病原物, 类病毒基因组不编码蛋白, 但对植物的侵染与病毒类似^[50-51]。通过机械接种或介体传播, 类病毒在植物细胞内自主复制, 系统扩散发病。RNA 沉默转基因对植物抵御类病毒侵染同样有效。Schwind 等构建了马铃薯纺锤块茎类病毒 *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) 的反向重复结构并转化番茄, 获得了抗性番茄^[52]。有趣的是, DNA 病毒也同样能成为 RNA 沉默的靶标。Zrachya 等构建番茄黄化曲叶病毒 *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) 外壳蛋白基因的反向重复结构, 转化番茄后, 抗病性测定表明侵染 7 周后转基因植株仍无症状表现, 对该病毒表现出明显抗性, 同时转基因不影响植物繁育, 植株可以正常开花结果^[53]。

人工 miRNAs (artificial miRNA, amiRNA) 介导的抗性转化是目前较热门的一个抗病品种获得方式。研究者们利用 amiRNA 在抗病毒植物方面进行了大量的研究。人们利用 miR159a 前体合成两种 amiRNA: amiR-HC-Pro 和 amiR-P69。其中 amiR-HC-Pro 与芜菁花叶病毒 *Turnip mosaic virus* (TuMV) 基因组 HC-Pro 基因的部分序列互补配对, amiR-P69 与芜菁花叶病毒 *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) 基因组 P69 基因的部分序列互补配对。转化植株后, 获得了抗 TuMV 和 TYMV 的植株^[54]。更多地了解内源 miRNA 在植物体内的作用过程, 将有助于我们完善 amiRNA 方法, 从而能更好地利用这一技术。

dsRNA 介导的植物抗性途径具有特异性强, 较易获得高抗甚至免疫的转基因植株, 且获得的抗病性可以高效稳定遗传等特点, 因此成为植物抗病毒基因工程研究中的一种高效抗性手段^[46]。另一方面, 通过 RNA 沉默介导的病毒抗性与传统工程抗病相比, 不但成功率高、特异性强, 而且病毒基因进入植物体后, 转录形成的 dsRNA 结构会被植物体

内的 DCL 酶特异识别降解成 21~24 nt 的小片段, 避免了病毒蛋白的翻译, 安全性更高。因此, RNA 沉默为植物抗病遗传育种提供了一条高效、特异的获得抗性植物的途径。

4 展望

植物 RNA 沉默转基因技术的开发展示了其控制昆虫和病毒危害的潜力。表达外源 dsRNA 的转基因植物可以成功地触发病毒和害虫中基因的沉默, 表明转基因植物 dsRNA 产生的 sRNA 不仅能降解植物中病毒的基因组序列, 而且能够转移 sRNAs 跨界沉默害虫的关键基因, 因此植物 RNA 沉默转基因技术在病虫害控制中展示出广阔的应用前景。目前, 利用植物 RNA 沉默转基因技术防治害虫大都处于试验阶段, 虽有部分产品即将投放市场, 但要成为主流的害虫防治技术仍需时间。利用 RNA 沉默的转基因抗病虫植物的安全问题也应引起重视。RNAi 转基因作物的潜在风险包括: 1) 靶外结合: 小 RNA 分子和非靶标 mRNA 序列相似并进行互作时, 会产生脱靶效应; 2) 靶标基因抗性: 利用 RNA 复制过程中的高突变性, RNA 病毒可逃避 RNAi 效应, 作物抗病性可能减弱甚至丧失; 3) RNAi 水平漂移: 小 RNA 分子可能因基因漂移诱导非靶标生物的基因沉默。随着 RNA 沉默技术的深入研究, 以及与其他技术的结合使用, 相信在不久的将来, 植物 RNA 沉默转基因技术在害虫防治、益虫保护和新型农药的开发等方面将会发挥越来越重要的作用。

参考文献

- [1] CAI Qiang, QIAO Lulu, WANG Ming, et al. Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes [J]. *Science*, 2018, 360(6393): 1126-1129.
- [2] PRICE D R, GATEHOUSE J A. RNAi-mediated crop protection against insects [J]. *Trends in Biotechnology*, 2008, 26(7): 393-400.
- [3] HUVENNE H, SMAGGHE G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2010, 56(3): 227-235.
- [4] FIRE A, XU Siquan, MONTGOMERY M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.
- [5] HUANG Juan, YANG Meiling, ZHANG Xiaoming. The function of small RNAs in plant biotic stress response [J]. *Journal of Inte-*

- grative Plant Biology, 2016, 58(4): 312–327.
- [6] ZHANG Xiaoming, NIU Dongdong, CARBONELL A, et al. ARGONAUTE PIWI domain and microRNA duplex structure regulate small RNA sorting in *Arabidopsis* [J/OL]. Nature Communication, 2014, 5: 5468. DOI:10.1038/ncomms6468.
- [7] ZHANG Xiaoming, ZHAO Hongwei, GAO Shang, et al. *Arabidopsis* Argonaute 2 regulates innate immunity via miRNA393* mediated silencing of a Golgi-localized SNARE gene, MEMB12 [J]. Molecular Cell, 2011, 42(3): 356–366.
- [8] HANNON G J. RNA interference [J]. Nature, 2002, 418(6894): 244–251.
- [9] RUIZ-FERRER V, VOINNET O. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses [J]. Annual Review of Plant Biology, 2009, 60: 485–510.
- [10] SCHOLTHOF K B, SCHOLTHOF H B. Induction and suppression of RNA silencing: insights from plant viral infections—a BARD workshop report [J]. Plant Molecular Biology, 2011, 75(3): 205–210.
- [11] VOINNET O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections [J]. Nature Reviews Genetics, 2005, 6(3): 206–220.
- [12] BOOKER M, SAMSONOVA A A, KWON Y, et al. False negative rates in *Drosophila* cell-based RNAi screens: a case study [J/OL]. BMC Genomics, 2011(12): 50. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/50>.
- [13] HAJERI P B, SINGH S K. siRNAs: their potential as therapeutic agents—Part I. Designing of siRNAs [J]. Drug Discovery Today, 2009, 14(17/18): 851–858.
- [14] BROWN K, SAMARSKY D. RNAi off-targeting: Light at the end of the tunnel [J]. Journal of RNAi Gene Silencing, 2006, 2(2): 175–177.
- [15] BAIY J, FISHILEVICH E, BOWLING A J, et al. Improved insect-proofing: expressing double-stranded RNA in chloroplasts [J]. Pest Management Science, 2018, 74(8): 1751–1758.
- [16] ZHANG Jiang, KHAN S A, HECKEL D G, et al. Next-generation insect-resistant plants: RNAi-mediated crop protection [J]. Trends in Biotechnology, 2017, 35(9): 871–882.
- [17] KHAN A M, ASHFAQ M, KHAN A A, et al. Evaluation of potential RNA-interference-target genes to control cotton mealybug, *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae) [J]. Insect Science, 2018, 25(5): 778–786.
- [18] PITINO M, COLEMAN A D, MAFFEI M E, et al. Silencing of aphid genes by dsRNA feeding from plants [J/OL]. PLoS ONE, 2011, 6(10): e25709. DOI:10.1371/journal.pone.0025709.
- [19] PITINO M, HOGENHOUT S A. Aphid protein effectors promote aphid colonization in a plant species-specific manner [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2013, 26(1): 130–139.
- [20] COLEMAN A D, PITINO M, HOGENHOUT S A. Silencing of aphid genes by feeding on stable transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. Methods in Molecular Biology, 2014, 1127: 125–136.
- [21] MAO Jianjun, ZENG Fanrong, ANDRE V W. Feeding-based RNA interference of a gap gene is lethal to the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum* [J/OL]. PLoS ONE, 2012, 7(11): e48718. DOI:10.1371/journal.pone.0048718.
- [22] KUMAR P, PANDIT S S, BALDWIN I T. Tobacco rattle virus vector: A rapid and transient means of silencing *Manduca sexta* genes by plant mediated RNA interference [J/OL]. PLoS ONE, 2012, 7(2): e31347. DOI:10.1371/journal.pone.0031347.
- [23] POREDDY S, LI J, BALDWIN I T. Plant-mediated RNAi silences midgut-expressed genes in congeneric lepidopteran insects in nature [J/OL]. BMC Plant Biology, 2017, 17(1): 199. DOI:10.1186/S12870-017-1149-5.
- [24] KUMAR P, PANDIT S S, STEPPUHN A, et al. Natural history-driven, plant-mediated RNAi-based study reveals *CYP6B46*'s role in a nicotine-mediated antipredator herbivore defense [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(4): 1245–1252.
- [25] MAO Yingbo, CAI Wenjuan, WANG Jiawei, et al. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol [J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(11): 1307–1313.
- [26] XIONG Yehui, ZENG Hongmei, ZHANG Yuliang, et al. Silencing the *HaHR3* gene by transgenic plant-mediated RNAi to disrupt *Helicoverpa armigera* development [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 9(4): 370–381.
- [27] BAUM J A, BOGAERT T, CLINTON W, et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference [J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(11): 1322–1326.
- [28] ZHA Wenjun, PENG Xinxin, CHEN Rongzhi, et al. Knock-down of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-mediated RNA interference in the hemipteran insect *Nilaparvata lugens* [J/OL]. PLoS ONE, 2011, 6(5): e20504. DOI:10.1371/journal.pone.0020504.
- [29] MAO Yingbo, TAO Xiaoyuan, XUE Xueyi, et al. Cotton plants expressing *CYP6AE14* double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms [J]. Transgenic Research, 2011, 20(3): 665–673.
- [30] BOLOGNESI R, RAMASESHADRI P, ANDERSON J, et al. Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) [J/OL]. PLoS ONE, 2012, 7(10): e47534. DOI:10.1371/journal.pone.0047534.
- [31] ZHANG Tao, ZHAO Yunlong, ZHAO Jianhua, et al. Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression

- in a fungal pathogen [J/OL]. *Nature Plants*, 2016, 2(10): 16153. DOI:10.1038/NPLANTS.2016.153.
- [32] JIN Weibo, WU Fangli. Characterization of miRNAs associated with *Botrytis cinerea* infection of tomato leaves [J/OL]. *BMC Plant Biology*, 2015(15):1. DOI:10.1186/S12870-014-0410-4.
- [33] XIN Mingming, WANG Yu, YAO Yingyin, et al. Diverse set of microRNAs are responsive to powdery mildew infection and heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J/OL]. *BMC Plant Biology*, 2010(10):123. DOI:10.1186/1471-2229-10-123.
- [34] RADWAN O, LIU Yu, CLOUGH S J. Transcriptional analysis of soybean root response to *Fusarium virguliforme*, the causal agent of sudden death syndrome [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011, 24(8): 958-972.
- [35] LI Yan, LU Yuangen, SHI Yi, et al. Multiple rice microRNAs are involved in immunity against the blast fungus *Magnaporthe oryzae* [J]. *Plant Physiology*, 2014, 164(2): 1077-1092.
- [36] CAI Qiang, HE Baoye, KOGEL K H, et al. Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi-nature's blueprint for modern crop protection strategies [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2018(46):58-64.
- [37] PADMANABHAN C, ZHANG Xiaoming, JIN Hailing. Host small RNAs are big contributors to plant innate immunity [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2009, 12(4): 465-472.
- [38] YANG Meiling, XU Zhongtian, ZHAO Wan, et al. Rice stripe virus-derived siRNAs play different regulatory roles in rice and in the insect vector *Laodelphax striatellus* [J/OL]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 219. DOI:10.1186/S12870-018-1438-7.
- [39] HUANG Juan, YANG Meiling, LU Lu, et al. Diverse functions of small RNAs in different plant-pathogen communications [J/OL]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7:1552. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01552.
- [40] BAULCOMBE D C. RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants [J]. *Plant Molecular Biology*, 1996, 32(1/2):79-88.
- [41] GOLEMBOSKI D B, LOMONOSSOFF G P, ZAITLIN M. Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(16): 6311-6315.
- [42] MALYSHENKO S I, KONDAKOVA O A, NAZAROVA JU V, et al. Reduction of tobacco mosaic virus accumulation in transgenic plants producing non-functional viral transport proteins [J]. *Journal of General Virology*, 1993, 74(Pt 6): 1149-1156.
- [43] LU R, MARTIN-HERNANDEZ A M, PEART J R, et al. Virus-induced gene silencing in plants [J]. *Methods*, 2003, 30(4): 296-303.
- [44] ADHIKARY D, KHATRI-CHHETRI U, TYMM F J M, et al. A virus-induced gene-silencing system for functional genetics in a betalainic species, *Amaranthus tricolor* (Amaranthaceae) [J/OL]. *Applications in Plant Sciences*, 2019, 7(2): e01221. DOI:10.1002/aps3.1221.
- [45] BAULCOMBE D C. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 1999, 2(2): 109-113.
- [46] WATERHOUSE P M, GRAHAM H W, WANG Mingbo. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(23): 13959-13964.
- [47] HU Qiong, NIU Yanbing, ZHANG Kai, et al. Virus-derived transgenes expressing hairpin RNA give immunity to *Tobacco mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus* [J/OL]. *Virology Journal*, 2011(8): 41. DOI:10.1186/1743-422X-8-41.
- [48] WANG Mingbo, ABBOTT D C, WATERHOUSE P M. A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2000, 1(6): 347-356.
- [49] BUCHER E, LOHUIS D, VAN POPPEL P M J A, et al. Multiple virus resistance at a high frequency using a single transgene construct [J]. *Journal of General Virology*, 2006, 87(Pt 12): 3697-3701.
- [50] FLORES R, HERNANDEZ C, MARTINEZ DE ALBA A E, et al. Viroids and viroid-host interactions [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2005, 43: 117-139.
- [51] TABLER M, TSAGRIS M. Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents [J]. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(7): 339-348.
- [52] SCHWIND N, ZWIEBEL M, ITAYA A, et al. RNAi-mediated resistance to *Potato spindle tuber viroid* in transgenic tomato expressing a viroid hairpin RNA construct [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2009, 10(4): 459-469.
- [53] ZRACHYA A, KUMAR P P, RAMARKRISHNAN U, et al. Production of siRNA targeted against TYLCV coat protein transcripts leads to silencing of its expression and resistance to the virus [J]. *Transgenic Research*, 2007, 16(3): 385-398.
- [54] NIU Qiwen, LIN Shishun, REYES J L, et al. Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance [J]. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(11): 1420-1428.

(责任编辑: 田 喆)