

# RNA 干扰及其在增强作物抵抗有害真核生物研究中的应用\*

任 琴<sup>1,2</sup> 郭志鸿<sup>1\*\*</sup> 王亚军<sup>1</sup> 谢忠奎<sup>1</sup> 王若愚<sup>1</sup>

(1 中国科学院寒区旱区环境与工程研究所 兰州 730000 2 中国科学院大学 北京 100049)

**摘要** RNAi 是一种序列特异的同源依赖型基因沉默现象,在真核生物中普遍存在,是生物体抵抗核酸入侵、调控自身基因表达的重要途径。RNAi 发现以后,很快就作为一种反向遗传学手段广泛应用于基因功能鉴定,并且在作物改良中得到了广泛应用,在作物抗病毒及品种改良方面得到了成功应用。近年来,随着对 RNAi 机制认识的不断加深, RNAi 技术作为一种增强植物抵抗线虫、草食昆虫、真菌等有害真核生物的新策略的研究逐渐展开,并取得了一定成果,展现出良好的发展前景。对 RNAi 及其在增强植物抵抗有害真核生物方面的研究进展进行了综述,并对 RNAi 作为一种持久抗病虫育种策略的前景进行了展望。

**关键词** RNAi 有害真核生物 害虫 寄生杂草 真菌

**中图分类号** Q819

危害植物的有害真核生物主要有真菌、卵菌、草食昆虫、寄生线虫和杂草等,其中大多数病虫害的发生和流行会造成作物产量的巨大损失和品质劣变,一些毁灭性病害的发生还可能危及世界农业生产和粮食安全<sup>[1-3]</sup>。目前,农业生产中防制病虫害的措施主要有轮作倒茬、化学控制和培育抗病品种三种途径。合理的轮作制度及栽培措施的改进尽管可以在一定程度上减轻病虫害危害<sup>[4-7]</sup>,但由于受种植业比较效益、种植习惯等因素的影响,这一措施在农业生产中无法得到有效利用。使用杀菌剂、杀虫剂等农药尽管可以较好控制病虫害的发生,但化学农药的大面积长时间使用,不仅会对人类健康造成危害,而且存在巨大的生态风险,危及我们赖以生存的环境,因此化学农药的使用不得受到限制<sup>[8]</sup>。培育抗性品种是公认的控制病虫害最经济、最有效的途径,但传统抗性育种手段耗时耗力,并且天然抗性资源十分有限,限制了抗性品种选育的进程<sup>[9-10]</sup>。转基因育种可以突破物种间的界限,利用其他

物种的抗性资源增强作物抗性,可以一定程度拓宽抗性基因来源,加速育种进程。但由于许多病原物和害虫具有极强的进化潜力,能够迅速克服新的抗性基因,不但使采用传统抗性育种手段选育的抗性品种在短期内被克服,连转基因的 Bt 毒性蛋白也在投放生产后不久逐渐失去效用<sup>[11-15]</sup>。所以,作物抗病虫害育种中抗性资源不足、新品种育成速度缓慢等问题日渐严峻。故探索新的作物病虫害持久抗性育种策略势在必行。

RNAi 自发现以后,作为一种强大的反向遗传学手段广泛应用于功能基因组研究<sup>[16]</sup>,同时在植物抗病毒育种中也迅速得到成功应用,并培育了许多抗病毒作物<sup>[17-24]</sup>。2001 年,Escobar 等<sup>[25]</sup>又成功应用 RNAi 技术增强了植物对细菌的抗性。随着对 RNAi 机理认识的不断加深,植物介导的 RNAi 也逐渐应用于增强植物对寄生线虫、草食昆虫、真菌、卵菌等真核有害生物抗性的研究。这些研究表明植物介导的 RNAi 可以沉默入侵真核生物中与寄主产生的 dsRNA 同源的基因,赋予寄主植物对入侵病、虫、草报复性精准打击的能力。RNAi 作为一种新的植物持久抗病、抗虫育种策略的优势逐渐显现。

收稿日期:2015-02-08 修回日期:2015-04-04

\* 国家自然科学基金(31101190)、中国科学院“国际人才计划”(2015VEB069)资助项目

\*\*通讯作者,电子邮箱:guozhong@hotmail.com

## 1 RNAi 机制

RNAi 是一种真核生物中普遍存在、进化上高度保守的同源依赖型基因沉默现象,其基本原理是:细胞中长的 dsRNA 或前体 pre-miRNA 能激活细胞中 RNase III 家族 Dicer(或 DCL)的活性,被其切割成 21 ~ 25bp 的小干扰 RNA (siRNA)或 miRNA(本文通称为小 RNA,即 sRNA,是引起 RNAi 干扰最主要的两种小 RNA)<sup>[26-27]</sup>;sRNA 与多蛋白复合体 AGO-Piwi 结合形成 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)<sup>[28]</sup>;RISC 以 sRNA 的反义链为向导,识别同源基因,然后通过使 RNA 聚合酶 II 释放、组蛋白乙酰化或 DNA 甲基化等途径引起相应基因转录水平基因沉默,通过 mRNA 剪切或阻止翻译引起转录后水平的基因沉默<sup>[29-33]</sup>。另外, sRNA 还可以作为引物,在 RDRP 作用下,以互补 mRNA 为模板合成新的 dsRNA,新合成的 dsRNA 被 Dicer 切割后形成次级 siRNA,实现 RNAi 信号放大<sup>[34]</sup>。RNAi 作为一种古老的基因沉默机制,是真核生物抵御病毒感染及抑制转座子活性、保持基因组稳定的重要途径,也在调控生物自身基因表达、控制生长发育进程中发挥着重要作用。最近的研究还发现, RNAi 也参与了寄主植物与真核病原菌的互作,病原菌能够通过向寄主中分泌 sRNA,劫持寄主的 AGO1 蛋白,选择性沉默寄主天然免疫相关基因表达而增强致病性<sup>[35-36]</sup>;而寄主植物也可以通过 RNAi 途径调控自身抗性基因的表达,增强抗病性<sup>[37]</sup>,并且还有推测认为植物中编码的 sRNA 一部分的靶标基因可能就是害虫基因<sup>[38]</sup>。

RNAi 参与植物与入侵真核生物的互作的前提是 RNAi 信号可以在两者之间传递。研究表明,作为 RNAi 信号的 sRNA 或 dsRNA 不但能够在同一生物的细胞间传递或通过输导组织进行远距离传输,实现 RNAi 的系统发生,也可以在密切接触的同一物种的不同个体或不同物种间转移,实现 RNAi 信号跨越物种的转移<sup>[39-43]</sup>。RNAi 信号在同一生物中通过细胞间传递或通过输导组织在同一生物体内远距离运输导致生物体特定基因的沉默称为系统性 RNAi; RNAi 信号在密切接触不同生物个体间传递或生物体通过摄取环境 dsRNA 或 siRNA 引起的基因沉默称为环境性 RNAi<sup>[44]</sup>。环境性 RNAi 是植物介导的 RNAi 增强其对有害真核生物抗性的理论基础,即植物中形成的以有害真核生物特定基因为靶标的 RNAi 信号被入侵的真

核生物通过取食、吸器吸收等途径摄取后,触发入侵生物 RNAi 机制,引起相应基因沉默,从而赋予植物报复入侵真核生物、给与其精确打击的能力。

## 2 RNAi 在抗植物寄生线虫研究中的应用

植物寄生线虫能够侵染绝大多数栽培物种类,造成粮食、纤维和园艺作物产量及品质大幅度下降,据估计全球每年因线虫引起的作物产量损失超过 1 250 亿美元,其中根结线虫、孢囊线虫等固着性内寄生线虫危害最为严重<sup>[45]</sup>。这些寄生线虫在进化过程中形成了独特的侵染机制,入侵植物根系后向维管组织迁移,并选择性地向寄主根部分泌寄生蛋白,使其基因表达模式向着有利于线虫寄生的方向发生显著改变,引起细胞生理和表型变化,形成巨细胞(根结线虫)或合胞体(孢囊线虫),为线虫持续提供生长和繁殖所需的营养,造成作物根系受损,为其它根部病害发生创造条件。大多数作物对线虫抗性很差,主要采用化学方法防治。

Fire 等<sup>[46]</sup>研究发现与反义 RNA 相比, dsRNA 能够更有效地引起秀丽线虫同源基因的沉默,进一步的研究发现通过饲喂、注射和浸泡都可以将外源 RNAi 信号传递到线虫中<sup>[47]</sup>。又有研究证明,发生转录后基因沉默的植物的总 RNA 提取物注射到线虫后会引发线虫相应基因发生沉默。这些工作的开展为采用植物介导的 RNAi 减轻线虫危害提供了依据<sup>[48]</sup>。Gheysen 等<sup>[49]</sup>的工作证明了在寄主植物内表达以根结线虫寄生基因为靶标的 dsRNA 可以引起寄主对线虫感染的抗性。随后,通过培育能够表达线虫特定基因 dsRNA 的植物以增强对线虫抗性的研究逐渐开展起来。Yadav 等<sup>[50]</sup>的研究表明,表达根结线虫剪接因子(splicing factor)和整合酶 integrase(一个染色体重构蛋白 a chromatin remodelling protein)特异 dsRNA 的转基因植物能够成功下调线虫相应基因表达,表现出对根结线虫的强烈抗性。Huang 等<sup>[51]</sup>采用植物介导的 RNAi 成功下调了 4 个根结线虫近缘种中一个刺激植物根系生长的线虫分泌多肽[secretory peptide (16D10)]编码基因,增强了植物对线虫的抗性,抗性水平介于 63% 到 90% 之间。转基因烟草表达以根结线虫锌指蛋白样转录因子编码基因为靶标的 dsRNA 能够有效控制线虫的危害。进一步研究发现,植物表达根结线虫转录因子基因的 dsRNA 能够下调寄生线虫该基因的表达,但转录因子功能的丧失对线虫并没有产生不良影响<sup>[52]</sup>。在抗根结线虫取得进展的同时,对 RNAi 信号吸收能力较差的孢

囊线虫抗性研究也取得了良好进展。Steeves 等<sup>[53]</sup> 培育的表达孢囊线虫主要精子蛋白基因 dsRNA 的大豆不但能够使寄生线虫繁殖能力大大降低,每克根组织中线虫的产卵量下降 68%,并且还会影响到线虫后代的繁殖能力,每克根组织产卵量下降 75%。Sindhu 等<sup>[54]</sup> 的实验证明表达 4 个线虫寄生基因的拟南芥可以使发育的雌虫的数量减少,在不同 RNAi 株系中雌虫减少量在 23% ~ 64% 之间。不但寄主植物稳定转化表达的 RNAi 信号可以引起线虫基因沉默,病毒介导的基因沉默也可以通过寄主植物传递给寄生线虫。Dubreuil 等<sup>[55]</sup> 以对根结线虫胚胎发育和幼虫运动能力有重要作用的肌钙蛋白 C 基因 *Mi-tnc* 和参与线虫和寄主植物互作的寄生基因钙网蛋白的致病基因 *Mi-crt* 为靶标,分别构建了烟草脆裂病毒 (TRV) 沉默载体 TRV::TNC 和 TRV::CRT,农杆菌渗透感染烟草后接种根结线虫,发现根结线虫卵及后代幼虫中相应基因的转录本大幅度减少,并且接种了 TRV::TNC 的烟草会使寄生线虫卵的孵化率降低了 59%,而接种 TRV::CR 虽然对已经成功寄生的线虫表型没有影响,但会影响后代的侵染寄主的能力,使线虫数量大幅度减少。siRNA 通过喂食后可进入感染幼虫的内部组织,触发沉默其寄生基因 *Mi-CRT* (根结线虫食管腺的一个钙网蛋白基因),在幼虫时期 *Mi-CRT* 基因沉默影响线虫的毒力<sup>[56]</sup>。Huang 等<sup>[57]</sup> 克隆了线粒体 ATP 合酶 b 亚单位基因 *MiASB*,使烟草脆裂病毒 (TRV) 介导的病毒诱导的基因沉默在南方根结线虫中表达,然后在番茄幼苗上接种线虫,60 天后,经 *MiASB* 沉默处理的幼苗跟对照相比,线虫数量减少了 64.3%。当线虫吸收能引起系统 RNAi 反应的 dsRNA 或 siRNA 后,很大范围细胞类型的基因表达被沉默。现在线虫已经成为 RNA 干扰基因沉默的模式生物,Lilley 等<sup>[58]</sup> 总结了植物中以寄生线虫基因为靶标的 dsRNA 的应用。

### 3 RNAi 在抗草食昆虫研究中的应用

草食昆虫采食植物地上组织部分,减少了植物光合组织的面积,导致植物体内光合产物的减少,影响植株生长与繁育,甚至导致植物死亡,对农林牧业造成严重的经济损失。就植物而言,同一种植物可能受到多种类型昆虫的取食<sup>[59]</sup>;有些草食昆虫的专食性特别强,只取食某种植物,这两种情况都会给植物带来非常大的危害。有研究报道温带森林的辽东栎叶片的被食频率竟高达 90%<sup>[59]</sup>。虽然昆虫对植物的取食压力使得

植物进化出多种防御机制,但是反过来昆虫为避免被饿死或毒死又进化出应对植物防御的机制<sup>[60]</sup>,这样就使得植物防虫害工作进展更加困难。

近期采用 RNAi 技术控制作物虫害的研究进一步拓展了 RNAi 在作物改良中的应用范围。线虫基因特异性抑制是可以通过喂养 dsRNA 实现的,最初认为把这种方法应用到昆虫中是不可行的,但是研究发现应用 RNAi 技术,得到耐食草昆虫的植物才刚刚得以实现,这为防治害虫,培育新一代的昆虫抗性农作物开辟了道路<sup>[61]</sup>。昆虫吸收 dsRNA 至少有两个途径:基于线虫的 SID-1 蛋白质的跨膜通道介导的摄取机制和“替代”的内吞作用介导的吸收机制<sup>[39]</sup>。Sivakumar 等<sup>[62]</sup> 利用 RNAi 技术细胞系实验,将 Sf21 昆虫细胞经过修饰后表达 HaAPN1 (棉铃幼上皮氨肽酶 N),然后经过 HaAPN1dsRNA 处理 48 小时后,HaAPN1 表达的 mRNA 及其蛋白质较对照分别降低 70%,导致 HaAPN1 表达细胞对苏云金芽孢杆菌的 Cry1Ac 杀虫蛋白的敏感性降低。与此同期,Mao 等<sup>[38]</sup> 培育了能表达棉铃虫 *cyp6ae14* 基因 (该基因编码一种能够代谢棉酚的蛋白,赋予棉铃虫对棉酚的抗性) dsRNA 的转基因烟草和拟南芥,棉铃虫取食转基因植物后肠中 *cyp6ae14* 基因转录本大幅度降低,使棉铃虫对棉酚的耐受力减弱,导致其营养不良,生长缓慢,甚至死亡。随后 Mao 等<sup>[63]</sup> 培育了能表达棉铃虫 *cyp6ae14* 基因 dsRNA 的转基因棉花,在幼虫喂食转基因植物 4 小时后,CYP6AE14 表达水平降低,CYP6AE14 蛋白水平下降,这些结果表明 dsCYP6AE14 转基因棉花对棉铃虫抗性增强。棉酚诱导的细胞色素 P450 中至少有这 5 种 (CYP321A1, CYP9A12, CYP9A14, CYP6AE11 和 CYP6B7) 促使棉铃虫耐受溴氰菊酯,幼虫通过取食 CYP9A14 基因 dsRNA 的转基因棉花和拟南芥后,表现出对菊酯杀虫剂更加敏感<sup>[64]</sup>。Baum 等<sup>[65]</sup> 培育了表达与美国西部玉米根虫 (western corn rootworm, WCR) 液泡 ATPase 编码基因同源的 dsRNA 的转基因玉米,增强了玉米对 WCR 的抗性,减轻了 WCR 对玉米的危害。Wang 等<sup>[66]</sup> 利用转录组测序 (RNA-seq) 和数字表达谱技术 (DGE-tag) 相结合,获得亚洲玉米螟卵、幼虫、蛹和成虫四个发育时期相关基因的表达时期、表达量、代谢通路及基因功能信息,针对其中 10 个幼虫期特异表达的基因合成 dsRNA,采用直接喷洒的方法对亚洲玉米螟幼虫进行处理,其中有 9 个基因的 5 天校正死亡率在 73% ~ 100% 之间,利用 Real-time PCR 的方法检测基因表达变化情

况,结果显示 dsRNA 处理后靶标基因的表达均有明显的下调。通过合成荧光 dsRNA 进行亚洲玉米螟幼虫的点滴试验,证明了 dsRNA 能够穿透昆虫体壁进入体腔从而实现基因干扰效果。RNAi 技术已经在其他鞘翅目叶甲虫、小菜蛾、斜纹夜蛾等十几种草食昆虫多个基因中得到成功应用<sup>[39]</sup>。最近的研究表明,如果昆虫的性信息素受体通过 RNAi 被沉默,可以阻塞交配或宿主植物寻求行为的通信系统,就可以有效地控制害虫种群,而不必直接杀死害虫,这是 RNAi 应用的另一前景<sup>[67]</sup>。以上说明,通过植物介导的 RNAi 沉默昆虫体内的特定基因表达,能够控制虫害的发生。并且与杀虫剂抗性有关的特定基因沉默能增加昆虫对杀虫剂的特异敏感性,这将有效减少使用化学农药和提高化学农药效率<sup>[68]</sup>。

#### 4 RNAi 在抗真菌研究中的应用

对植物来说,大多数病害都是由真菌引起的,由真菌引起的粮食作物病害已成全球性粮食安全问题,如果能控制这种病害在五大粮食作物中的传播,全球每年可多养活 6 亿人。随着全球化时代人员和各种物品大范围流通,原来仅限于某地的真菌感染也更容易扩散,其趋势有加重迹象。现在水稻、小麦、玉米、马铃薯和黄豆这五大粮食作物,都出现了由真菌引起的病害,如稻瘟病、大豆锈病、小麦秆锈病、玉米丝黑穗病和土豆晚疫病<sup>[69]</sup>。

RNA 干扰技术作为真菌分子生物学研究或遗传改造的工具具有特殊的意义,因为真菌中丝状真菌具有多核和发生非同源重组频率高的特点,难以用基因敲除手段进行改造。最近几年,以绿色荧光蛋白基因和红色荧光蛋白基因为报告基因,在植物病原真菌 *M. oryzae*、*Venturia inaequalis*、*Colletotrichum lagenarium* 及模式丝状真菌 *N. crassa* 中建立了 RNA 干扰方法,并利用 RNAi 研究这些真菌某些重要基因的功能<sup>[70]</sup>。Liu 等<sup>[71]</sup>于 2002 年利用 hpRNA 表达载体诱导担子菌类病原真菌 *Cryptococcus neoformans* 的 CAP59 和 ADE2 基因的沉默,这是 RNAi 技术在抗真菌研究中的首次运用。随后,在稻瘟病菌中使用 RNA 沉默系统分析增强型绿色荧光蛋白 (eGFP) 基因,在沉默转化后,发现绿色荧光蛋白 mRNA 的积累急剧减少<sup>[72]</sup>。Nicolás 等<sup>[73]</sup>的研究结果表明,这两种白化和野生型菌株具有相同水平的未剪接 carB 的 mRNA 前体,而沉默菌株成熟 carB 的 mRNA 的量至少比野生型少 6 倍,卷枝毛霉基因沉默发

生在转录后水平,影响成熟 mRNA 积累,但未影响转录的速率。Tinoco 等<sup>[74]</sup>的研究也表明,将转 gus 基因的拟轮生镰刀菌接种到表达 gus-dsRNA 的转基因烟草后,拟轮生镰刀菌的转基因 gus 表达被沉默。Sun 等<sup>[75]</sup>的研究数据表明,RNAi 介导的 acuD 基因的沉默能减轻马尔尼非青霉的毒性从而在慢性期能减轻感染马尔尼非青霉裸鼠的真菌负担。Trippe 等<sup>[76]</sup>研究表明双链 RNA 介导的 CYP52L1 基因的转录后沉默,很大程度上降低了 *Graphium* sp. (ATCC 58400) 这种真菌氧化烷烃和醚类的能力。Salame 等<sup>[77]</sup>综述了 RNAi 技术已在 40 多种真菌中得到成功应用。Mascia 等<sup>[78]</sup>表明,RNAi 可以不用植物中间介导,通过病毒诱导的基因沉默在植物病原真菌炭疽病 *acutatum* (菌株 C71) 表达,但是基于植物病毒,用烟草的重组病毒载体直接感染烟草花叶病毒 (TMV),用类似方法在携带绿色荧光蛋白 (GFP) 异位表达的重组烟草花叶病毒载体中观察到相应基因沉默的现象。

卵菌 (*Oomycetes*) 属于色菌界 (*Chromista*),由于其形态特征和生活习性与真正的真菌 (true fungi) 相似,通常被称为真菌。许多卵菌是植物病原菌,能引起多种农作物、花卉等发生灾难性病害,如大豆疫霉菌 (*Phytophthora sojae*) 引起的大豆疫霉根腐病、致病疫霉 (*Phytophthora infestans*) 引起的马铃薯晚疫病和橡树疫霉 (*P. ramorum*) 引起的橡树猝死病<sup>[79]</sup>。

van West 等<sup>[80]</sup>将致病疫霉分泌型激发因子编码基因 *infl* 的编码区反向和/或正向导入致病疫霉,导致转基因致病疫霉 *infl* 基因的沉默,首次证明了致病疫霉中 RNAi 机制的存在;进一步对转基因致病疫霉与野生型致病疫霉通过细胞质体融合获得的异核体的研究发现,*infl* 不但在异核体中保持沉默,在异核体非转基因的后代中也保持沉默,说明致病疫霉中沉默信号能在不同细胞核间传递。Whisson 等<sup>[81]</sup>建立了基于原生质体培养的外源 dsRNA 介导的致病疫霉瞬时基因沉默技术体系,采用人工合成的长度为 150 ~ 300bp 的 dsRNA 转染致病疫霉,激发了致病疫霉 RNAi 机制,分别引起致病疫霉转基因 *gfp*、内源基因 *infl* 及 *cdc14* 的特异性沉默。Judelson 等<sup>[82]</sup>将表达与致病疫霉 *nifc1* 基因同源的发夹型 RNA 的载体导入致病疫霉,引起 *nifc* 家族基因 (*nifc1*, *nifc2* 和 *nifc3*) 的沉默,导致转基因致病疫霉游动孢子的萌发率大幅度降低。随后, Grenville-Briggs 等<sup>[83]</sup>人工合成分别与致病疫霉 *ces1*, *ces2*, *ces3* 和 *ces4* 同源的 4 种 dsRNA,转染致病疫霉原生质体后抑制了 4

个 *ces* 基因的表达,导致转染后致病疫霉细胞壁纤维素含量不到野生型的 50%。Colditz 等<sup>[84]</sup>利用 RNAi 技术敲除苜蓿 PR10-1 基因[苜蓿感染豌豆根腐病菌后感应类 10 病原相关 (PR) 蛋白基因],蛋白质组学分析 MtPr10-1 和另外 5 个 PR-10 型标注为脱落酸反应蛋白 (ABR17s) 基因也被有效沉默,跟对照相比,接种病原菌的苜蓿根部病菌的定植明显减少了,在转 MtPr10-1i 基因的根部也抑制了病原感染,凝胶分析也证实了苜蓿增强了豌豆根腐病耐受性。水霉寄生的酪氨酸酶基因 SpTyr 是水霉菌生物合成途径不可或缺的基因,原生质体体外合成 SpTyr 的 dsRNA 介导了基因沉默,酪氨酸酶活性下降,黑色素生成量减少<sup>[85]</sup>。Stamler 等<sup>[86]</sup>将体外合成 *cdc14* 基因的 dsRNA 使用电穿孔法导入到辣椒疫霉,游动孢子的生产量显著下降。当植物生产 dsRNA 时辣椒疫霉侵染叶片的能力被抑制,游动孢子的生产量也减少约 46%。该技术在疫霉研究中的应用及越来越多疫霉基因功能的鉴定使得 RNAi 用于控制卵菌的发生和流行,增强植物抗性这方面的应用越来越实用。总之, RNAi 在植物真菌相互作用中以真菌特异性为靶标设计抗真菌剂,可以适用于广泛的抗真菌研究<sup>[87]</sup>。

任琴等在实验室构建了以致病疫霉单拷贝的翻译延伸因子 *tefl* 为靶标的 RNAi 载体、以多拷贝的 *gpi* 基因为靶标的 RNAi 载体、同时与晚疫病菌 4 个 *ces* 基因均同源的融合基因 *C<sub>1234</sub>* 为靶标的 RNAi 载体和以几丁质酶基因为靶标的 RNAi 载体,采用农杆菌介导法转入晚疫病易感马铃薯品种大西洋,进行转基因植株晚疫病抗性的分析鉴定。其中,采用重叠延伸 PCR 技术克隆同时与晚疫病菌 4 个 *ces* 基因均同源的融合基因 *C<sub>1234</sub>*,构建了内含子连接的 *C<sub>1234</sub>* 反向重复序列植物表达载体,采用农杆菌介导法转化晚疫病易感马铃薯品种大西洋,经 PCR 和 Southern 杂交检测,获得了 129 个转基因株系。离体叶片接种病原菌后,有 97 个转基因株系发病速度明显慢于野生型,接种 6 d 后病斑大小和霉层厚度均明显小于对照,并且叶片感病部位没有出现失绿斑,而野生型产生了明显的失绿斑。实时定量 RT-PCR 分析发现,发病延缓的叶片上致病疫霉 4 个纤维素合成酶基因的表达水平明显低于野生型。研究表明转基因植株中产生的以晚疫病菌 *ces* 基因为靶标的 dsRNA 能够沉默致病疫霉相应基因表达,延缓发病进程。

## 5 RNAi 在抗寄生杂草研究中的应用

植物界高等寄生植物约有 3000 ~ 5000 种,可导致主要粮食作物和工业农作物减产 30% ~ 80%<sup>[88]</sup>。其中寄生杂草是影响农作物生长和导致农作物产量和质量下降的高等寄生植物之一;其主要特性为不能独立地进行光合作用制造养分,必须寄生在别的植物上靠特殊的吸器吸取寄主的养分而生活,且种类繁多,分布广泛,寄主范围广,从寄主吸取水分、矿物质和光合产物的同时降低寄主的生长和竞争能力,对寄主的破坏性极大。作物被寄生杂草寄生后主要表现为生长缓慢,还会出现不同程度的生物量降低甚至死亡<sup>[89]</sup>。同时粮食和果实品质显著降低,例如大麻列当 (*Phelipanche ramosa*) 侵染番茄后,番茄鲜质量、干质量、硬度、还原糖、可溶性固体物含量和抗坏血酸含量等降低,果色变差,严重影响果实品质,降低其市场价值<sup>[90]</sup>。

寄生杂草中经济危害最大的当属 broomrapes (列当属,列当科), witchweeds (独脚金属,玄参) 和菟丝子 (菟丝子属)<sup>[91]</sup>, 所以对其研究也最多。有研究指出寄生植物的机理与其抗病原菌机理相似<sup>[92]</sup>, 所以使用 RNAi 技术亦可以实现寄生杂草特定基因的沉默。Aly 等<sup>[93]</sup>利用伴胞中表达绿色荧光蛋白 (GFP) 的转基因番茄探索寄主和寄生杂草之间的蛋白质运动,实验发现转基因番茄被分枝列当寄生后,大量的 GFP 从寄主植物的韧皮部转移到寄生杂草的韧皮部,最终积累于列当的结节与芽。列当科的半寄生植物 *Triphysaria versicolor* 能够从寄主植物莴苣中摄取 RNAi 信号分子,导致自身转基因 *gus* 的沉默,并且能将沉默信号传递其寄生的另外一株莴苣<sup>[94]</sup>。甘露 6-磷酸还原酶 (M6PR) 是甘露醇生物合成的关键酶, Aly 等<sup>[95]</sup>将寄生杂草分枝列当的 6-磷酸甘露糖还原酶 (M6PR) 基因作为靶基因得到转基因番茄,转基因番茄产生同源 dsRNA 将列当科寄生杂草的 M6PR 基因沉默,定量 RT-PCR 分析显示转基因番茄植株上生长的埃及列当结节和地下芽的内源 M6PR mRNA 的量减少 60% ~ 80%, 继而甘露醇水平显著降低,番茄植株上坏死结节比例显著提高。de Framond 等<sup>[96]</sup>以 5 个独脚金基因为靶标构建发夹型结构 dsRNA 载体转化玉米,观察发现寄生转基因玉米的独脚金生长速度表现出一定的差异,与对照相比具有不可再生力。Bandaranayake 等<sup>[97]</sup>将 *Triphysaria versicolor* 的胞质乙酰-CoA 羧化酶 (ACC 酶)

基因发夹结构 RNAi 载体导入苜蓿,在所有样本中均发现当列当科杂草寄生转基因寄主时其根的生存能力至少减少 80%, RT-PCR 表明 *Triphysaria* 中 ACC 酶转录水平显著下降。这项工作表明, ACC 酶是抑制寄生植物反式特异性基因沉默的有效靶点。最近的研究表明,烟草脆裂病毒 (TRV1 和 TRV2) 诱导的 *S. hermonthica* 八氢番茄红素去饱和酶 (PDS) 基因的 RNAi 载体能有效沉默独脚金的同源基因,导致 PDS 基因在独脚金中的表达量下调,漂白其叶片<sup>[98]</sup>。虽然寄生杂草几十年都是棘手的问题,但是目前在基因组学上的进步将给这类研究带来一场革命,加快其前进的步伐<sup>[99]</sup>。通过 RNAi 技术降解寄生杂草靶 mRNA 并导致致命性伤害或抑制寄生植物的发展,从而控制杂草疯长防止其危害农作物,对稳定农作物产量、促进农业生产和保障世界粮食安全意义重大。

## 6 展 望

植物地上部与地下部病原物如细菌、真菌、病毒和线虫等对植物叶片与根系的直接取食、损伤等不仅直接或间接影响植物的生长发育<sup>[100]</sup>,更对粮食产量及果蔬质量造成严重影响。有害真核生物已严重影响了世界各地的农业生产力,每年造成巨大的农作物产量损失。植物介导的 RNAi 在农作物病虫害防治方面具有广泛的应用潜力。同时,也可以通过 RNAi 控制植物病原菌毒素的生长从而提高食品安全性。RNAi 是一种高频、高效、高度特异的基因沉默技术,但是其干扰效率却有待提高,主要原因可能是当植物病原体渗入植物细胞内吸取营养成分时能有效避开植物自身的防御监测机制,从而不能让植物立即作出防御反应激发入侵有害真核生物的 RNAi 机制从而影响了干扰效率。植物介导的有害真核生物 RNAi 是通过在植物中形成 dsRNA 或 siRNA 等 RNAi 信号分子,经寄生、取食等途径传递到有害真核生物中,病原真菌入侵后如何使植物快速有效地发现并积极做出反应激发 RNAi 机制则需要更加深入的研究。

## 参考文献

- [ 1 ] Haverkort A J, Boonekamp P M, Hutten R, et al. Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. *Potato Research*, 2008, 51(1): 47-57.
- [ 2 ] Niu J H, Jian H, Xu J M, et al. RNAi technology extends its reach: engineering plant resistance against harmful eukaryotes. *Afr J Biotechnol*, 2010, 9(45): 7573-7582.
- [ 3 ] Oerke E C. Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 2006, 144(01): 31-43.
- [ 4 ] 朱有勇, 陈海如, 范静华, 等. 利用水稻品种多样性控制稻瘟病研究. *中国农业科学*, 2003, 36(5): 521-527.  
Zhu Y Y, Chen H R, Fang J H, et al. The use of rice variety diversity for rice blast control. *Scientia Agricultura Sinica*, 2003, 36(5): 521-527.
- [ 5 ] Scholte K. Effect of crop rotation on the incidence of soil-borne fungal diseases of potato. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 1992, 98(2): 93-101.
- [ 6 ] Whiting K R, Crookston R K. Host-specific pathogens do not account for the corn-soybean rotation effect. *Crop Science*, 1993, 33(3): 539-543.
- [ 7 ] Hwang S F, Ahmed H U, Gossen B D, et al. Effect of crop rotation on the soil pathogen population dynamics and canola seedling establishment. *Plant Pathology Journal (Faisalabad)*, 2009, 8(3): 106-112.
- [ 8 ] Getsinger K D. Chemical control research in the corps of engineers. *Journal of Aquatic Plant Management*, 1998, 36: 61-64.
- [ 9 ] Harms C T. Engineering genetic disease resistance into crops: biotechnological approaches to crop protection. *Crop Protection*, 1992, 11(4): 291-306.
- [ 10 ] Johnson R. Classical plant breeding for durable resistance to diseases. *Journal of Plant Pathology*, 2000, 82(1): 3-7.
- [ 11 ] Fry W. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology*, 2008, 9(3): 385-402.
- [ 12 ] Leach J E, Vera Cruz C M, Bai J, et al. Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology*, 2001, 39(1): 187-224.
- [ 13 ] McDonald B A, Linde C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 2002, 40(1): 349-379.
- [ 14 ] Janmaat A F, Myers J. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2003, 270(1530): 2263-2270.
- [ 15 ] Candas M, Loseva O, Oppert B, et al. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* alterations in the indianmeal moth larval gut proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2003, 2(1): 19-28.
- [ 16 ] Eamens A, Wang M B, Smith N A, et al. RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. *Plant Physiology*, 2008, 147(2): 456-468.
- [ 17 ] Shekhawat U K, Ganapathi T R, Hadapad A B. Transgenic banana plants expressing small interfering RNAs targeted against

- viral replication initiation gene display high-level resistance to banana bunchy to Pvirus infection. *Journal of General Virology*, 2012, 93 (Pt 8): 1804-1813.
- [18] Seemanpillai M, Dry I, Randles J, et al. Transcriptional silencing of geminiviral promoter-driven transgenes following homologous virus infection. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2003, 16(5): 429-438.
- [19] Pooggin M, Shivaprasad PV, Veluthambi K, et al. RNAi targeting of DNA virus in plants. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(2): 131-132.
- [20] Aragão F J L, Faria J C. First transgenic geminivirus-resistant plant in the field. *Nature Biotechnology*, 2009, 27(12): 1086-1088.
- [21] Buchmann R C, Asad S, Wolf J N, et al. Geminivirus AL2 and L2 proteins suppress transcriptional gene silencing and cause genome-wide reductions in cytosine methylation. *Journal of Virology*, 2009, 83(10): 5005-5013.
- [22] Rodríguez-Negrete E A, Carrillo-Trip P J, Rivera-Bustamante R F. RNA silencing against geminivirus: complementary action of posttranscriptional gene silencing and transcriptional gene silencing in host recovery. *Journal of Virology*, 2009, 83(3): 1332-1340.
- [23] Zhang Z, Chen H, Huang X, et al. BSCTV C2 attenuates the degradation of SAMDC1 to suppress DNA methylation-mediated gene silencing in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 2011, 23(1): 273-288.
- [24] Itaya A, Folimonov A, Matsuda Y, et al. Potato spindle tuber viroid as inducer of RNA silencing in infected tomato. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2001, 14(11): 1332-1334.
- [25] Escobar M A, Civerolo E L, Summerfelt K R, et al. RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(23): 13437-13442.
- [26] Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature*, 2004, 431(7006): 356-363.
- [27] Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 2004, 431(7006): 343-349.
- [28] Hannon G J. RNA interference. *Nature*, 2002, 418(6894): 244-251.
- [29] Lippman Z, Martienssen R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature*, 2004, 431(7006): 364-370.
- [30] Wassenegeger M, Heimes S, Riedel L, et al. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell*, 1994, 76(3): 567-576.
- [31] Jones L, Ratcliff F, Baulcombe D C. RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Current Biology*, 2001, 11(10): 747-757.
- [32] Mette M F, Aufsatz W, Van der Winden J, et al. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *The EMBO Journal*, 2000, 19(19): 5194-5201.
- [33] Zilberman D, Cao X, Jacobsen S E. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, 2003, 299(5607): 716-719.
- [34] Novina C D, Sharp P A. The mai revolution. *Nature*, 2004, 430(6996): 161-164.
- [35] Weiberg A, Wang M, Lin F M, et al. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science*, 2013, 342(6154): 118-123.
- [36] Pumplin N, Voinnet O. RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(11): 745-760.
- [37] Vetukuri R R, Åsman A K, Tellgren-Roth C, et al. Evidence for small RNAs homologous to effector-encoding genes and transposable elements in the oomycete *Phytophthora infestans*. *PloS One*, 2012, 7(12): e51399.
- [38] Mao Y B, Cai W J, Wang J W, et al. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(11): 1307-1313.
- [39] Huvenne H, Smaghe G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *Journal of Insect Physiology*, 2010, 56(3): 227-235.
- [40] McEwan D L, Weisman A S, Hunter C P. Uptake of extracellular double-stranded RNA by SID-2. *Molecular Cell*, 2012, 47(5): 746-754.
- [41] Knip M, Constantin M E, Thordal-Christensen H. Trans-kingdom cross-talk: small RNAs on the move. *PLoS Genetics*, 2014, 10(9): e1004602.
- [42] Aly R. Trafficking of molecules between parasitic plants and their hosts. *Weed Research*, 2013, 53(4): 231-241.
- [43] Molnar A, Melnyk C W, Bassett A, et al. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science*, 2010, 328(5980): 872-875.
- [44] Whangbo J S, Hunter C P. Environmental RNA interference. *Trends in Genetics*, 2008, 24(6): 297-305.
- [45] Chitwood D J. Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service. *Pest Management Science*, 2003, 59(6-7): 748-753.
- [46] Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.

- [47] Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 1998, 395(6705): 854-854.
- [48] Boutla A, Kalantidis K, Tavernarakis N, et al. Induction of RNA interference in *Caenorhabditis elegans* by RNAs derived from plants exhibiting post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(7): 1688-1694.
- [49] Gheysen G, Vanholme B. RNAi from plants to nematodes. *Trends in Biotechnology*, 2007, 25(3): 89-92.
- [50] Yadav B C, Veluthambi K, Subramaniam K. Host-generated double stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2006, 148(2): 219-222.
- [51] Huang G, Allen R, Davis E L, et al. 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*, 2006, 103(39): 14302-14306.
- [52] Fairbairn D J, Cavallaro A S, Bernard M, et al. Host-delivered RNAi: an effective strategy to silence genes in plant parasitic nematodes. *Planta*, 2007, 226(6): 1525-1533.
- [53] Steeves R M, Todd T C, Essig J S, et al. Transgenic soybeans expressing siRNAs specific to a major sperm protein gene suppress *Heterodera glycines* reproduction. *Functional Plant Biology*, 2006, 33(11): 991-999.
- [54] Sindhu A S, Maier T R, Mitchum M G, et al. Effective and specific in planta RNAi in cyst nematodes; expression interference of four parasitism genes reduces parasitic success. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(1): 315-324.
- [55] Dubreuil G, Magliano M, Dubrana M P, et al. Tobacco rattle virus mediates gene silencing in a plant parasitic root-knot nematode. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(14): 4041-4050.
- [56] Arguel M J, Jaouannet M, Magliano M, et al. siRNAs trigger efficient silencing of a parasitism gene in plant parasitic root-knot nematodes. *Genes*, 2012, 3(3): 391-408.
- [57] Huang Y, Mei M, Mao Z, et al. Molecular cloning and virus-induced gene silencing of MiASB in the southern root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *European Journal of Plant Pathology*, 2014, 138(1): 181-193.
- [58] Lilley C J, Davies L J, Urwin P E. RNA interference in plant parasitic nematodes: a summary of the current status. *Parasitology*, 2012, 139(05): 630-640.
- [59] 于晓东, 周红章, 罗天宏. 辽东栎叶片昆虫取食形状多样性及其变化模式. *植物生态学报*, 2001, 25(5): 553-560.
- Yu X D, Zhou H Z, Luo T H. Patterns of damage by phytophagous insects on leaves of *Quercus liaotungensis*. *Journal of Plant Ecology*, 2001, 25(5): 553-560.
- [60] Coley P D, Barone J A. Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1996, 27: 305-335.
- [61] Price D R, Gatehouse J A. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends in Biotechnology*, 2008, 26(7): 393-400.
- [62] Sivakumar S, Rajagopal R, Venkatesh G R, et al. Knockdown of aminopeptidase-N from *Helicoverpa armigera* larvae and in transfected Sf21 cells by RNA interference reveals its functional interaction with *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein Cry1Ac. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(10): 7312-7319.
- [63] Mao Y B, Tao X Y, Xue X Y, et al. Cotton plants expressing CYP6AE14 double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms. *Transgenic Research*, 2011, 20(3): 665-673.
- [64] Tao X Y, Xue Y I, Huang Y P, et al. Gossypol - enhanced P450 gene pool contributes to cotton bollworm tolerance to a pyrethroid insecticide. *Molecular Ecology*, 2012, 21(17): 4371-4385.
- [65] Baum J A, Bogaert T, Clinton W, et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(11): 1322-1326.
- [66] Wang Y, Zhang H, Li H, et al. Second-generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18644.
- [67] Zhao Y Y, Liu F, Yang G, et al. PsOr1, a potential target for RNA interference-based pest management. *Insect Molecular Biology*, 2011, 20(1): 97-104.
- [68] Bautista M A M, Miyata T, Miura K, et al. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 39(1): 38-46.
- [69] Fisher M C, Henk D A, Briggs C J, et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 2012, 484(7393): 186-194.
- [70] 王绍文, 刘刚, 邢苗, 等. 丝状真菌中的 RNA 干扰及其应用技术. *生物技术通报*, 2011, 10: 014.
- Wang S W, Liu G, Xing M, et al. Advances in filamentous fungal RNA interference and its application technology. *Biotechnology Bulletin*, 2011, 10: 014.
- [71] Liu H, Cottrell T R, Pierini L M, et al. RNA interference in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genetics*, 2002, 160(2): 463-470.
- [72] Kadotani N, Nakayashiki H, Tosa Y, et al. RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2003, 16(9): 769-776.
- [73] Nicolás F E, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez R M. Two classes of small antisense RNAs in fungal RNA silencing triggered by non-



- integrative transgenes. The EMBO Journal, 2003, 22 ( 15 ) : 3983-3991.
- [74] Tinoco M L, Dias B B, Dall' Asta R C, et al. *In vivo* trans-specific gene silencing in fungal cells by in planta expression of a double-stranded RNA. BMC Biology, 2010, 8(1) : 27.
- [75] Sun J, Li X, Feng P, et al. RNAi-mediated silencing of fungal *acuD* gene attenuates the virulence of *Penicillium marneffeii*. Medical Mycology, 2014, 52(2) : 1-2.
- [76] Trippe K M, Wolpert T J, Hyman M R, et al. RNAi silencing of a cytochrome P450 monooxygenase disrupts the ability of a filamentous fungus, *Graphium* sp. , to grow on short-chain gaseous alkanes and ethers. Biodegradation, 2014, 25(1) : 137-151.
- [77] Salame T M, Ziv C, Hadar Y, et al. RNAi as a potential tool for biotechnological applications in fungi. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(3) : 501-512.
- [78] Mascia T, Nigro F, Abdallah A, et al. Gene silencing and gene expression in phytopathogenic fungi using a plant virus vector. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111 (11) : 4291-4296.
- [79] Lamour K, Kamoun S. Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Interactions and Research Tools. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2009.
- [80] van West P, Kamoun S, van't Klooster J W, et al. Internuclear gene silencing in *Phytophthora infestans*. Molecular Cell, 1999, 3 (3) : 339-348.
- [81] Whisson S C, Avrova A O, Van West P, et al. A method for double-stranded RNA-mediated transient gene silencing in *Phytophthora infestans*. Molecular Plant Pathology, 2005, 6(2) : 153-163.
- [82] Judelson H S, Tani S. Transgene-induced silencing of the zoosporegenesis-specific NIFC gene cluster of *Phytophthora infestans* involves chromatin alterations. Eukaryotic Cell, 2007, 6 (7) : 1200-1209.
- [83] Grenville-Briggs L J, Anderson V L, Fugelstad J, et al. Cellulose synthesis in *Phytophthora infestans* is required for normal appressorium formation and successful infection of potato. The Plant Cell Online, 2008, 20(3) : 720-738.
- [84] Colditz F, Niehaus K, Krajinski F. Silencing of PR-10-like proteins in *Medicago truncatula* results in an antagonistic induction of other PR proteins and in an increased tolerance upon infection with the oomycete *Aphanomyces euteiches*. Planta, 2007, 226(1) : 57-71.
- [85] Saraiva M, De Bruijn I, Grenville-Briggs L, et al. Functional characterization of a tyrosinase gene from the oomycete *Saprolegnia parasitica* by RNAi silencing. Fungal Biology, 2014, 118(7) : 621-629.
- [86] Stamler R A, Goldberg N P, Sanogo S, et al. *In vitro* and *in vivo* RNAi silencing of *Phytophthora capsici*. Phytopathology, 2012, 102(7) : 114-114.
- [87] Moazeni M, Nabili M, Badali H, et al. RNAi technology: A novel approaches against fungal infections. Research in Molecular Medicine, 2014, 2(3) : 1-10.
- [88] Aly R. Conventional and biotechnological approaches for control of parasitic weeds. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2007, 43(4) : 304-317.
- [89] Balázs E, Vurro M, Gressel J. Managing parasitic weeds: integrating science and practice. Pest Management Science, 2009, 65(5) : 451-452.
- [90] Longo A M G, Lo Monaco A, Mauromicale G. The effect of *Phelipanche ramosa* infection on the quality of tomato fruit. Weed Research, 2010, 50(1) : 58-66.
- [91] Parker C. Observations on the current status of Orobanche and Striga problems worldwide. Pest Management Science, 2009, 65 (5) : 453-459.
- [92] Yoder J I, Scholes J D. Host plant resistance to parasitic weeds; recent progress and bottlenecks. Current Opinion in Plant Biology, 2010, 13(4) : 478-484.
- [93] Aly R, Hamamouch N, Abu-Nassar J, et al. Movement of protein and macromolecules between host plants and the parasitic weed *Phelipanche aegyptiaca* Pers. Plant Cell Reports, 2011, 30(12) : 2233-2241.
- [94] Tomilov A A, Tomilova N B, Wroblewski T, et al. Trans-specific gene silencing between host and parasitic plants. The Plant Journal, 2008, 56(3) : 389-397.
- [95] Aly R, Cholakh H, Joel D M, et al. Gene silencing of mannose 6-phosphate reductase in the parasitic weed *Orobanche aegyptiaca* through the production of homologous dsRNA sequences in the host plant. Plant Biotechnology Journal, 2009, 7(6) : 487-498.
- [96] de Framond A, Rich P J, McMillan J, et al. Effects of *Striga parasitism* of Transgenic Maize Armed with RNAi Constructs Targeting Essential *S. asiatica* Genes. Integrating New Technologies for Striga Control: Toward Ending the Witch-Hunt Hackensack, NJ: World Scientific, 2007. 185-196.
- [97] Bandaranayake P C, Yoder J I. Trans-specific gene silencing of acetyl-CoA carboxylase in a root-parasitic plant. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2013, 26(5) : 575-584.
- [98] Kirigia D, Runo S, Alakonya A. A virus-induced gene silencing (VIGS) system for functional genomics in the parasitic plant *Striga hermonthica*. Plant Methods, 2014, 10(1) : 16.
- [99] Westwood J H, Pamphilis C W, Das M, et al. The Parasitic Plant Genome Project: new tools for understanding the biology of Orobanche and Striga. Weed Science, 2012, 60(2) : 295-306.
- [100] Liu R J, Chen Y L. Mycorrhizology. Beijing: Science Press, 2007. 152; 289-319.

## RNA Interference and Its Application in Enhancing Crop Resistance Against Harmful Eukaryotes

REN Qin<sup>1,2</sup> GUO Zhi-hong<sup>1</sup> WANG Ya-jun<sup>1</sup> XIE Zhong-kui<sup>1</sup> WANG Ruo-yu<sup>1</sup>

(1 Cold and Arid Regions Environmental and Engineering Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

(2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract** RNAi is a common specific sequence homology-dependent gene silencing phenomenon in eukaryotes, it is an important way to regulate gene expression for resistant to nuclease invasion. Since being found, RNAi is widely used in gene function identification, and has been widely applied in crop and antiviral improvement as a kind of reverse genetics methods. In recent years, with the deepening understanding of RNAi, RNAi showed good promising prospects as a new strategy to enhance plant resistance to nematodes, herbivorous insects, fungi and other harmful eukaryotes and achieved some results. RNAi and its research progress in enhancing plant resistance to harmful eukaryotes, and the prospect of persistent pest resistance breeding strategies for RNAi were summarized.

**Key words** RNAi Harmful eukaryotes Pests Parasitic weeds Fungi

---

## 广 告 索 引

北京中原领先科技有限公司(封面),默克化工技术(上海)有限公司(封二),赛多利斯科学仪器(北京)有限公司(彩1),梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司(彩2),沃特世科技(上海)有限公司(彩3),赛默飞世尔科技(中国)有限公司(彩4),上海森松制药设备工程有限公司(彩5),镇江东方生物工程设备技术有限责任公司(彩6-7),通用电气医疗系统贸易发展(上海)有限公司(目次对页),伯乐生命医学产品(上海)有限公司(封三),江苏省科海生物工程设备有限公司(封底)