

植物小 RNA 与 RNA 干扰: 生物学功能与应用前景

毛颖波, 薛学义, 陈晓亚*

中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 植物分子遗传国家重点实验室, 上海 200032

* 联系人, E-mail: xychen@sibs.ac.cn

收稿日期: 2008-10-14; 接受日期: 2008-11-24

国家自然科学基金(批准号: 30630008)和国家重点基础研究发展计划(批准号: 2007CB108800)资助项目

摘要 RNA 干扰(RNAi)的发现使人们对基因调控有了新的认识, 同时它也逐渐发展为遗传分析、疾病治疗以及植物保护等方面一种非常有用的新技术. 本文重点介绍 RNAi 的生物学功能及其在农业上的应用前景. 为更好地了解 RNAi, 本文还简要回顾了 RNAi 的发现历史并简单阐述小 RNA 生成途径和 RNAi 的分子机制.

关键词

RNA 干扰
基因调控
植物保护

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是近期发现的一种新的基因调控机制, 它利用RNA序列匹配, 专一地识别靶基因, 在转录水平、转录后水平或翻译水平抑制靶基因表达. 非常有趣的是, RNAi的发现, 其初衷并不是为了回答某个生物学问题, 而是意在解释线虫(*Caenorhabditis elegans*)中双链RNA(dsRNA)能够诱导序列特异的基因沉默反应这一现象^[1]. 随着对RNAi认识的增加, 人们提出了一个假设, 即同源dsRNA引发的基因沉默在生物体中是一种普遍现象. 这一假设与转基因以及病毒诱导的基因沉默现象相一致.

1 RNAi 的发现

RNAi 现象首先在植物和真菌中被观测到. 随着研究的深入, 人们发现 RNAi 参与了对病毒的防御.

1.1 植物中转录后水平的基因沉默

人们发现在转基因植物中, 转入的外源基因以及内源同源基因的表达经常会产生由RNA降解引起的基因沉默. 1990年, Napoli等人^[2]发表了一个令人惊讶的发现: 在矮牵牛(*Petunia hybrida*)花中用 35S启动子过量表达查尔酮合酶(chalcone synthase, CHS)来

提高酶的水平, 结果CHS活性反而降低了将近一半. 矮牵牛的紫色花是由查尔酮的积累引起的, 由于转基因植物中查尔酮含量的减少, 使得花色改变, 呈紫色、白色相间色. 核糖核酸酶保护实验表明, 正常的CHS转录本减少并积累大量降解的CHS mRNA, 这一现象被称为共抑制(co-suppression). 随后, 许多类似的共抑制现象被报道^[3-5]. 所有共抑制现象都有一个共同的特点: 内源的和外源转入的基因转录本在转录后水平都显著减少, 所以共抑制又被称为转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS). Waterhouse等人^[6]首先发现在植物中, 双链RNA分子能诱导PTGS现象. 他们证明, 在被病毒感染后, 能同时产生与病毒基因组同源的正义和反义RNAs的植物比那些只能产生正义或反义RNA的植物能更有效地抵御病毒的入侵. Fire等人^[1]发现dsRNA能够引发线虫中的基因沉默. 这两个独立的发现揭示RNAi是生物体普遍存在的基因调控机制.

1.2 病毒诱导的基因沉默

在 20 世纪早期, 植物学家发现, 被某种温和的非致病病毒感染过的植物能产生一定的抗性抵御另一种比较接近的强致病病毒的入侵. 这一现象可以

用PTGS来解释: 当第一种温和病毒入侵时, 诱导植物产生PTGS, 而当第二种致病病毒入侵时, 由于其基因组与第一种病毒的基因组相似, 因此通过PTGS途径被降解, 使植物产生抗性. 同时人们还发现将来源于病毒的基因转入到植物中表达, 即使只有RNA而没有蛋白产物也能使植物产生抗性^[7]. 根据病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)的原理, 将宿主基因与病毒基因组结合改造成载体, 通过转基因获得的植物, 其宿主基因的表达被明显抑制^[8,9]. VIGS已被应用于植物功能基因组的研究.

2 RNAi 的主要特征

RNAi的主要特征可归纳为以下3点: (1) 引发基因沉默的信号分子是与靶基因具有同源序列的小RNA^[10]; (2) 组成RNA降解复合体的蛋白组分在大多数生物体中具有相似的结构和功能; (3) 在多数情况下, RNAi效应能够被传播和放大.

2.1 小 RNA 的种类

在研究RNAi的过程中, 双链RNA被归纳到了小RNA之中. 在一项对植物转基因和病毒诱导的转录后基因沉默机制的研究中, 检测到了反义RNA, 这些小RNA分子长度大约是25个核苷酸^[11]. 现在已经知道, 正是这些小的RNA分子诱导了基因沉默. 22个左右核苷酸长度的小RNA, 根据其来源不同可被大体分为微小RNA(microRNAs, miRNAs)和小干扰RNA(small interfering RNAs, siRNAs)^[12]. 植物中, 相同的蛋白组分和重叠的功能组成了RNA沉默这个复杂的网络. miRNAs是短的、内源产生的、21~24个核苷酸长的非编码RNA分子. miRNAs由RNA聚合酶转录产生, 经过5'加帽和3'多聚腺嘌呤化生成初级miRNA(pri-miRNA), 再经过两步Dicer酶切割产生前miRNA(pre-miRNA)和成熟的miRNA. 成熟的miRNA与Argonaute(AGO)蛋白结合一起进入RNA诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC), 在那里通过序列特异的碱基配对切割靶标mRNA或者抑制其翻译^[13].

小干扰RNAs(siRNAs), 或短干扰RNAs, 一般为20~24个核苷酸, 来自于转基因、内源重复序列、病毒或转座子. 植物中, siRNAs由长的双链RNA经

Dicer样的RNase家族的酶(DCL)切割产生. 在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中至少存在3类siRNAs: 分别是染色质相关siRNAs(chromatin-associated siRNAs)、内源性反义siRNAs(natural antisense transcript siRNAs, nat-siRNAs)和反式作用siRNAs(trans-acting siRNAs, ta-siRNAs).

染色质相关siRNAs主要是由DCL3/RDR2/RNA polymerase a途径产生, 而且主要与AGO4相互作用, 通过影响组蛋白甲基化、DNA甲基化或者染色质重排引起转录沉默^[14-16]. nat-siRNAs首先是在拟南芥中发现的, 为天然存在相互重叠的顺式反义RNA, 来自其中一个的nat-siRNA可以调节另一个转录产物的稳定性. 它的产生需要DCL1, HYL1, HEN1, RDR6, NRDP1A和SGS3的参与^[17-19]. ta-siRNAs是一种内源的非编码小RNA, 其前体是miRNA靶基因切割后的产物. 依赖RNA的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRP)被招募到初始转录物上并以此为模板产生长的双链RNA, 这些双链RNA进而被加工成多个ta-siRNAs^[20]. ta-siRNAs与miRNAs相同, 反式作用于靶基因. 最近, 人们又发现了几种新的小RNAs. piwi-interacting RNAs(piRNAs)和重复序列相关siRNAs(repeat-associated siRNAs, rasiRNAs)是在哺乳动物生殖细胞中发现的一类26~31个核苷酸长度的小RNA^[21,22]. 长siRNAs(long siRNAs, lsiRNAs)是在拟南芥中发现的30~40个核苷酸长度, 与siRNAs有很多共同点的小RNA. 动物生殖细胞的piRNAs和rasiRNAs不需要Dicer蛋白, lsiRNAs的生物合成则需要DCL1/DCL4/AGO7的参与^[23].

miRNAs和ta-siRNAs主要是在转录后水平调节生长发育. 在拟南芥中, 大部分的小RNA是siRNA, 它们在生命的各个过程中都起重要作用, 包括病毒防御, 转基因/转座子沉默, 异染色质化和mRNA的转录后调节等^[24].

miRNAs和siRNAs有很多共同点. 二者都是由长的RNA前体经过Dicer样的RNA酶加工而来, 都被装载到含有AGO蛋白的RNA诱导沉默复合体中, 在那里小RNA通过碱基配对抑制靶基因的表达^[25,26]. miRNAs和siRNAs的主要不同是他们前体的分子形式不同, miRNAs来自于一条含有茎环结构的RNA分子, 而siRNAs则是产生于长的双链RNA分子. 二者

还有以下几点不同: (1) 对于来自转基因、转座子和重复序列的 siRNA, 其作用靶点恰好是产生其自身的那些序列, 而 miRNA 则不是; (2) 很多 miRNA 在相近的物种中是保守的, 但多数内源的 siRNA 不保守^[27-29]; (3) 虽然 miRNA 和 siRNA 生成过程中所需要的蛋白相同或相关, 但在很多生物中, miRNA 和 siRNA 行使功能时所需的蛋白是不同的. 如许多拟南芥 siRNA 的产生需要 RdRP, miRNA 则不需要^[30-32]. 此外, 大多数拟南芥 miRNA 是由 DCL1 加工产生, 而多数内源的 siRNA 则由 DCL3 或 DCL4 加工而成^[27,33].

2.2 RAN 干扰机制

RNAi 是指 RNA 引起的序列特异的基因表达抑制. 虽然双链 RNA 的产生途径可能不同, 但是小 RNA 的加工和效应过程却有一个通用模式. Dicer 和 AGO 是 RNAi 的关键因子. Dicer 基因家族编码的蛋白具有 C 端双链 RNA 结合域, RNA 螺旋酶功能域, RNase 以及 PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) 功能域. 小鼠和人只有一个 Dicer, 这个 Dicer 将茎环 RNAs 和双链 RNAs 加工成 miRNAs 和 siRNAs^[34]. 在拟南芥基因组中已发现 4 个 DCL 基因, DCL1 催化 miRNA 的产生, DCL2 则参与病毒防御, DCL3 在 DNA 甲基化和表观调节过程中起作用, 但并不参与 miRNA 合成和病毒防御^[30,35,36], DCL4 是最主要的参与病毒防御的 Dicer, 产生 21 个核苷酸的病毒干扰 RNA (virus-derived short interfering RNAs, viRNA), 同时 DCL4 还介导 ta-siRNA 的加工^[37].

AGO 蛋白具有 3 个典型的结构域, N 端的 PAZ 结构域, C 端的 PIWI 结构域和位于中间的 Mid 结构域^[38,39]. PAZ 负责与 RNA 结合^[40,41], PIWI 域在结构和功能上与 RNA 酶 H 相似, 使得 RISC 具有了内切核酸酶的活性来切割靶基因^[42]. 拟南芥有 10 个 AGO 蛋白, 其中 AGO1 是唯一已知的参与 miRNA 的生物功能的成员, AGO4 和 AGO6 在 rasiRNA 的积累、RNA 介导的 DNA 甲基化以及转座子和重复序列转录沉默中起重要作用^[43-45]. AGO7 似乎参与了 ta-siRNA 介导的植物发育时间的调节^[46,47]. 拟南芥 AGO 蛋白家族的多样性和种类繁多的小 RNA 给人们提出了疑问, 这些小 RNA 如何被分配到不同的 AGO 蛋白中去? 威益军实验室^[44]通过免疫沉淀和深度测序, 将对应于 4 个

AGO 蛋白的小 RNA 进行分类和分析, 发现每个 AGO 蛋白正是通过识别 5' 末端核苷酸招募一类小 RNA. AGO2 和 AGO4 优先招募 5' 端是腺嘌呤的小 RNA, 而 AGO1 则与具有 5' 端尿嘧啶的 miRNAs 结合, AGO5 主要捕获以胞嘧啶开头的小 RNAs. 这些实验结果说明了小 RNA 选择正确的 AGO 相结合对于它们正常行使生物功能是必须的^[48]. 拟南芥中, 在 Dicer 切割之后, 与 AGO 结合之前, 小 RNA 要经过 *Hua Enhancer 1 (HEN1)* 基因编码的甲基转移酶对其 3' 核糖的甲基化, 以及 Importin β 类的蛋白 HASTY 的 (HST) 将 miRNA/miRNA* 从细胞核运输到细胞质的过程, 才能最终产生成熟的 miRNA^[49,50].

2.3 RNAi 系统性扩散

系统性 RNAi (systemic RNAi) 是指 RNAi 效应从初始位点扩散到生物体的其他组织并引起靶基因沉默, 甚至传给下一代的现象. 系统性 RNAi 要经过多个步骤, 包括信号放大和信号传播. 系统性 RNA 沉默是在研究转基因烟草共抑制现象过程中首先发现的. 将硝酸还原酶 (nitrate reductase, Nia) 基因转入烟草之后发生了叶片黄化, 这种黄化开始只是随机地出现在叶片上, 但随后会扩散到新长出的叶片^[51,52]. 人们发现在植物中, RNAi 的扩散有时会被限制在 10~15 层细胞中^[53], 但有时也会在不同组织间长距离运输^[54].

细胞与细胞间的 RNAi 扩散是通过胞间连丝完成的, 而长距离的运输则是通过韧皮部来完成的, 因为这种运输总是遵循从库到源的模式^[55,56]. 最近, Dunoyer 等人^[53,57]通过遗传筛选鉴定出参与拟南芥细胞间沉默信号传递的关键因子. 他们分离到了 3 类沉默信号传递缺失突变体 (silencing-movement-deficient, smd). 分析发现, SMD1 和 SMD2 分别是 RDR2 和 NRPD1a 的两个等位基因, 二者在细胞与细胞之间, 而非细胞内的 RNAi 过程中起作用. 同时还发现, DCL4 产生的 21 个核苷酸的 siRNA 是细胞间沉默信号的关键组分. 与此同时, Brosnan 等人^[58]通过嫁接实验发现, NRPD1a, RDR2, 和 DCL3 参与了顶端接受长距离 RNAi 信号的过程. Smith 等人^[59]发现了一个含有 SNF2 结构域的 CLASSY1 蛋白在细胞核中与 RDR2 和 NRPD1a 相互作用, 在转基因沉默信号扩散

和内源的 24 个核苷酸的 siRNA 的产生过程中起作用。线虫系统性 RNAi 是在注射双链 RNA 的实验中被偶然发现的。后来的研究^[60,61]发现, 给线虫饲喂表达了双链 RNA 的细菌或者让线虫吸收含双链 RNA 的培养基都能够引起系统性 RNAi 的产生。这说明双链 RNA 分子能够在线虫肠道环境中生存。通过遗传筛选系统性 RNAi 的关键因子, Winston 等人^[62]发现 *SID-1* (*systemic RNA interference deficient-1*) 基因足以介导线虫的系统性 RNAi。线虫 *SID-1* 的同源基因在多种昆虫中都有发现, 如赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*)、家蚕 (*Bombyx mori*)、玉米食虫 (*Diabrotica virgifera virgifera*) 和蜜蜂 (*Apis mellifera*), 而果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 中没有。但是有实验证据表明, 果蝇 S2 细胞吸收双链 RNA 分子不是依靠 *SID-1* 途径, 而是一种 scavenger 受体介导的细胞内吞机制^[63]。最近, 人们还发现了另一个参与线虫双链 RNA 吸收的基因 *SID-2*。*SID-2* 是一个具有一次跨膜结构域的肠道特异表达的膜蛋白。*SID-2* 突变之后, 饲喂表达了双链 RNA 的细菌引起的 RNAi 就会丧失, 但不影响注射引起的 RNAi^[64]。

线虫中, 初级 siRNAs 作为 RdRP 的模板产生次级 siRNAs。这种信号放大过程是线虫的 RNAi 效应所必需的^[65-67]。赤拟谷盗, 一种在昆虫发育研究中被广泛应用的甲虫, 与线虫一样, 也具有非常强烈的系统性 RNAi 效应^[68]。赤拟谷盗的全基因组测序已于今年完成并公布^[69]。比对发现, 与线虫不同, 赤拟谷盗没有 RdRP, 说明线虫和赤拟谷盗拥有不同的系统性 RNAi 信号放大过程。赤拟谷盗一定具有一个与线虫 RdRP 活性相似的蛋白或者一个不同的机制^[68]。

3 生物学功能

自 RNAi 被发现以来, 人们很快注意到其与许多重要的生物学功能相联系, 几乎所有被研究的真核生物中都有与 RNAi 相关事件的报道。RNAi 的生物学功能遍布生物体的整个生命周期, 包括: 发育、代谢、对逆境的反应、疾病的抗性以及其他各个方面。

3.1 小 RNAs 与发育调控

作为基因表达的调控因子, miRNAs 与许多重要的发育过程相关。如在线虫中, LIN-14 作为重要的转

录因子, 在时空上调控胚胎后期的发育进程, 它受到 *lin-4* miRNA 的负调控^[26]。Bantam 是果蝇中编码调节发育相关的 miRNA, 控制细胞分裂并通过负调控与凋亡相关的 *HID* 基因抑制细胞凋亡^[70]。在植物中, 有关 miRNA 介导发育上的基因调控被大量报道, 很多 miRNA 的靶基因本身就是一个发育的调节因子, 如转录因子、F-box 蛋白等。大量研究表明, miRNA 在调控生长素信号途径以及叶片发育方面起重要的作用^[71]。植物根尖分生组织分成两部分: 不能进行减数分裂的静止中心 (QC) 和分布在 QC 周围具有 4 种类型干细胞的初生区, 根尖干细胞分裂分化受到严格的调控。拟南芥中根冠细胞的形成受到生长素响应因子 (auxin response factor) *ARF10* 和 *ARF16* 的调控, 而这两个 *ARF* 基因是受 miR160 调节的。当用 35S 启动子过量表达 miR160c 时, *ARF10* 和 *ARF16* 的表达被抑制, 造成根冠细胞分裂分化紊乱, 形成肿瘤状根尖并丧失向地性^[72]。除 miRNA 外, siRNAs 在植物发育过程中也起到了重要作用。*RDR6* 在 siRNA 加工途径中起重要作用, *RDR6* 缺失突变体表现为叶形态发育异常^[73]。植物开花时间受到 FCA 和 FPA 的严格调控, 这两个调控因子通过 siRNA 介导的染色体上 DNA 甲基化发挥作用^[74]。通过对水稻 DCL4 的遗传分析发现水稻发育过程受 siRNA 调控^[75]。

3.2 RNAi 与抗病反应

如前所述, 病毒侵染能诱导植物 RNAi 途径, 专一识别和降解入侵病毒和宿主中的同源基因^[76]。因此病毒诱导的 RNAi 同时伴随宿主植物从最初的病毒感染中恢复过来。感染过病毒的组织恢复后对同一种病毒的再次感染不再表现致病性状, 产生较强的抗性。烟草蚀刻病毒 (TEV) 的侵染能使烟草表现病症, 但是表达编码全长 TEV 外壳蛋白基因的转基因烟草在被 TEV 侵染后, 虽早期有轻微症状出现, 但在 3~5 周后症状消失^[77]。由于被免疫后的植物对另一种比较近似的马铃薯病毒 (PVY) 的感染仍表现出敏感症状, 因此这种抗性具有病毒专一性。这可能是植物研究中将 RNA 沉默与病毒感染联系起来的最早发现。随后, RNA 介导的病毒抗性在很多双子叶植物中被报道^[78], 在单子叶植物中也观察到了类似现象^[79]。另一方面, 许多导致植物感病的病毒蛋白也是 RNAi 途

径的抑制子^[80]. 拟南芥对芜菁皱纹病毒(TCV)的感染呈现感病症状. TCV含有编码p38 衣壳蛋白的基因, 它是RNAi途径很强的抑制子. 当TCV感染植物后, p38 通过抑制DCL4 的活性阻断RNAi途径, 导致植物表现病症. 烟草脆裂病毒(TRV)是一较为温和的病毒, 在拟南芥中不引起病症, 但若将p38 引入到TRV中表达, 这一病毒则能引起拟南芥的病症^[81].

植物中的RNAi同时还对细菌的入侵有一定的作用. 根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)是一种较强的致病菌, 能在被感染的宿主植物中形成根瘤. 有趣的是, 表达p38 的转基因植物和RNAi突变体rdr6 一样表现出更严重的感病症状^[82]. 这些结果说明RNAi在植物抗细菌病方面具有重要作用.

后来的研究发现, 在致病细菌入侵后, 植物体内的siRNA合成被诱导. 如前所述, 拟南芥nat-siRNA主要产生于两个相互有重叠的转录本. nat-siRNAATGB2与细菌性病菌抗性相关, 能专一地被含有 avrRpt2 蛋白的细菌性斑点病菌(*Pseudomonas syringae*)诱导. nat-siRNAATGB2 能与 PPRL 互补结合并调控 PPRL 的表达. 而 PPRL 负调控能够引发一系列抗性反应的防御基因R蛋白(RPS2)的表达^[18]. 次年, 同一研究室又发现一类长度在 30~40 核苷酸左右的受致病细菌诱导的 siRNA, lsiRNA, 它们具有 siRNA 的很多特性^[23]. 这些发现再次证明植物siRNA参与了对细菌性病菌的防御反应. 另一项研究^[83]发现, 一个负调控生长激素受体基因(*TIR1*, *AFB2* 和 *AFB3*)的 mRNA (miR393)能被细菌性病菌鞭毛蛋白诱导, 从而抑制生长激素应答途径, 而这种生长激素应答途径的阻断可以抑制宿主植物中细菌性病菌(*P. syringae*)的生长. 这些结果说明 miRNA 通过抑制生长素应答途径参与了植物对细菌性病菌的防御. 近期人们从 *P. syringae* 中分离得到了 RNAi 途径的抑制子, 这说明, 细菌也能像病毒那样通过阻断宿主的RNAi途径使植物致病^[84].

RNAi 不仅在植物中, 同时还在动物中参与抗病毒反应. Flock house 病毒(FHV)属于 *Nodaviridae* 病毒家族, 其基因组为一个正义链 RNA. 当 FHV 感染果蝇细胞不久后, 发现在果蝇细胞内含有大量 22 核苷酸长的病毒RNA分子^[11]. 而当果蝇细胞内与RNAi相关的基因 *AGO2* 失活后, 全长的病毒 RNA 分子大

量积累^[85]. 最近的研究发现在哺乳动物细胞中, 干扰素 β (IFN β)能够调控miRNA 的表达. 在这些miRNA中, 有些能与丙型肝炎病毒(HCV)的基因组 RNA 互补结合. 与 IFN β 诱导相似, 将人工合成的这类miRNA 导入到哺乳动物细胞后, 能使细胞阻止 HCV 病毒的复制和感染, 从而产生抗性^[86].

3.3 RNAi 与植物逆境反应

与动物不同, 植物固着生活, 不能自由移动, 这要求对周围的各种逆境环境如干旱、土壤盐分和极端气温等有更的忍耐力与适应性. 植物参与逆境反应的组分已被大量报道, 多数是编码与逆境反应有关的蛋白. 除蛋白质外, 最近的研究表明, miRNAs 和内源 siRNAs 同样在逆境反应中担当重要角色.

以拟南芥为例, 某些miRNAs的表达可受到非生物逆境的诱导. 如在大多数逆境条件下miR397b 和 miR402 的表达会被诱导, 寒冷、干旱、NaCl或激素ABA处理会诱导miR393 的表达, 而miR319 的表达能被低温诱导却不受干旱的影响^[87]. 这些发现提示, 不同的miRNAs参与不同的逆境反应. 当植物处于逆境条件下, 细胞内会积累过量的活性氧(ROS). 拟南芥 *CSD1* 和 *CSD2* 基因分别编码细胞质和叶绿体的Cu/Zn超氧化物歧化酶. *CSD1* 和 *CSD2* 能清除超氧化物在细胞内的积累. 研究发现这两个基因的表达受到miR398 的调控^[88]. 在正常生长条件下, *CSD1* 和 *CSD2* 的转录本受到miR398 的负调控维持在一个非常低的水平, 而在响应过高氧化物浓度时, miR398 的表达受到抑制, 使其对*CSD1* 和 *CSD2* 转录本的负调控降低, 导致体内这两个酶的水平提高, 使超氧化物可以被及时地清除.

一个与高盐逆境的耐受性有关的小RNA是 *SRO5-P5CDH* nat-siRNA. 这一nat-siRNA产生于逆境相关基因*P5CDH*(吡咯羧酸酯脱氢酶)和*SRO5* 两个转录本 3'端的重合部分^[89]. 高盐处理能诱导*SRO5* 的表达, *SRO5* 的诱导表达促进了*SRO5-P5CDH* nat-siRNA的形成. *SRO5-P5CDH* nat-siRNA 能够与*P5CDH*的 3'端结合起负调控作用. 在RNAi突变体 *dcl2*, *sgs3*, *rdr6* 和 *nprdl1a* 中, *SRO5-P5CDH* nat-siRNAs合成被阻断. 当这些突变体受到高盐环境胁迫时, *P5CDH*表达不能被有效地抑制, 使得脯氨酸不

能在体内积累造成对高盐环境的敏感^[89]。

3.4 RNAi 与植物抗虫

植物有多种抵抗植食性昆虫的方法。多数植物能积累大量防御物质, 如对昆虫有毒性的次生代谢化合物, 这被称为静态的防御反应^[90]。另一方面, 植物能够感知其他生物的侵袭, 诱导特异的防御反应途径, 这被称为可诱导的防御反应。当昆虫侵袭植物后, 植物的防御反应途径能被昆虫激发子专一诱导, 这使得植物能更好地感知不同生物的侵袭, 优化防御反应途径。最近一项研究表明, 当 RNA 指导的 RNA 聚合酶 1(RdR1)被抑制后, 烟草(*Nicotiana attenuate*)对昆虫的侵袭变得敏感^[91]。在植物中, RdRP 蛋白是将 dsRNA 加工成成熟的 siRNA 所必需的。植物激素如茉莉酸(JA)介导大量与抗虫相关的防御反应。正常植物在昆虫激发子的作用下, JA 途径被诱导, 而 *rdr1* 突变体的诱导转录本的表达水平则有所改变, JA 途径削弱而乙烯途径增强。外源添加 JA 可以完全恢复 *rdr1* 对昆虫的抗性。通过对小 RNA 的测序分析发现, 在 *rdr1* 和正常植物中, 小 RNA 的组成发生了变化。当遭到烟青虫(*Heliothis assulta*)侵袭或受到昆虫激发子诱导后, *rdr1* 和正常植物中的小 RNA 只有很小一部分(<5%)的变化是一致的, 因此推测植物激素信号途径的一些基因的表达受到小 RNA 的调控。这些结果说明小 RNA 直接参与了对昆虫的防御反应。

虫害严重影响农作物产量和农产品品质, 人们已做出巨大努力来减少虫害对农作物的影响。线虫可以吸收食物中的 dsRNA, 导致体内靶基因的表达通过 RNAi 途径被抑制, 这暗示了环境中的 dsRNA 通过取食渠道进入到生物体内行使 RNAi 作用的可能性。外源 dsRNA 是否也能通过昆虫的中肠进入到昆虫体内起作用呢? 本实验室^[92]与另一研究小组^[93]相继报道了当昆虫进食了表达 dsRNA 的转基因植物后, 体内相应的靶基因受到抑制。这一方面说明 dsRNA 可以通过取食从植物传递到昆虫体内, 另一方面暗示植物小 RNA 可能直接参与了对昆虫取食的防御。

越来越多的发现为我们展示了一个神秘复杂的小 RNA 世界。拟南芥中至少有 4 个 *DCL* 基因参与了 RNAi 途径, 而在动物和真菌中一般只有 1~2 个 *Dicer*。

为了研究小 RNA 在植物中的复杂作用, 研究人员对拟南芥的小 RNA 进行了大规模高通量测序(MPSS), 结果令人吃惊: 在花序和幼苗中有将近 150 万的小 RNA, 其中只有很小一部分确定了靶基因。有许多小 RNA 的靶点位于以前认为的染色体不活跃区^[94]。早期研究^[95]从水稻 cDNA 文库发现了 20 个 miRNA 基因, 只有 7 个确定了靶基因, 剩下 13 个 miRNAs 的功能未知。人们还通过芯片研究了水稻 miRNA 的表达谱^[96]。最近, Ramanjulu 等人^[97]又从水稻中发现了 23 个新的小 RNA 基因及 40 个小 RNA 候选基因, 测序分析发现, 其中只有 6 个新的 miRNAs 在单子叶植物中是保守的。在油菜(*Brassica napus*)中, 人们鉴定了 11 个保守的 miRNA 家族和两个新的 miRNA^[98]。最近, 人们又在芜菁(*Brassica rapa*)中发现了 9 个在十字花科中保守的 miRNA^[99]。这些新发现的 miRNAs 的生物学功能有待于进一步研究。丰富多样的植物小 RNA 从一个侧面说明其生物学功能一定比我们已知的更加复杂。

4 RNAi 的应用

RNAi 是生物体具有的一种自然现象, 存在于几乎所有的真核生物中。它通过 RNA 序列识别, 专一地抑制靶基因的表达。自发现以来, RNAi 不仅成为研究基因功能的有效手段, 在疾病治疗和农业研究方面也有广阔的应用前景。本文主要阐述 RNAi 技术在改良作物性状方面的应用。

4.1 基因功能研究

由于 RNAi 能专一性地抑制基因的表达, 它很快成为研究基因功能的一种有效手段。在果蝇中, RNAi 被用来鉴定包括与胚胎发育、信号转导途径以及其他生命过程的基因功能^[100]。产生发夹结构 RNA 的载体被广泛应用, 通过转基因在植物中表达 dsRNA, 能有效抑制植物体内的靶基因表达。病毒诱导的基因沉默是有效抑制基因表达的另一主要手段^[101]。利用 VIGS 技术的一个主要优点在于, 只需要通过病毒感染而无需转基因就能有效抑制靶基因在宿主植物的表达, 简便省时。VIGS 为转基因操作较难的农作物如棉花(*Gossypium* spp.)^[102]和大豆(*Glycine max* L.)^[103]的功能基因组研究提供了一个很好的平台。

许多昆虫缺乏合适的转基因体系,这成了昆虫分子生物学的限制因素.向昆虫组织注射dsRNA,能有效地抑制基因表达,从而为昆虫基因的功能研究提供有力帮助.苏云金杆菌(Bt)中的一类具有杀虫作用的晶体蛋白能与昆虫中肠上的受体结合,导致肠壁穿孔引起昆虫死亡.预测分析显示Slapn编码氨基肽酶,利用RNAi技术发现Slapn是Bt蛋白受体.向斜纹夜蛾幼虫注射与Slapn相应的dsRNA,幼虫体内Slapn的表达被抑制,对Bt蛋白产生抗性^[104],从而鉴定了Slapn在Bt蛋白杀虫活性中的作用.有些昆虫对植物产生的有毒物质(如乌本苷)表现出一定的抗性.昆虫为什么能避免多种有毒化合物的影响?为阐明这一现象的分子机制,科学家做了大量工作.通过RNAi技术,发现*oatp58Db*在中肠主动运输乌本苷的过程中发挥作用.当*oatp58Db*的表达被RNAi被抑制后,乌本苷的主动运输被抑制,从而使幼虫对食物中的乌本苷变得更为敏感^[105].RNAi技术还证明粉虫(*Tenebrio molitor*)中的一个43 kD蛋白负调控受酚氧化酶诱导的黑色素合成途径^[106].大量研究实例表明RNAi是研究单个基因功能的一个重要技术.不仅如此,RNAi还可用于功能基因组的高通量筛选.例如,利用RNAi技术筛选线虫1号和3号染色体,鉴定了一类与细胞分裂和胚胎发育相关的基因^[107,108].利用RNAi技术大规模分析线虫19,427个候选基因,分析由RNAi产生的突变体表型,从中确定了1,722个基因的功能^[109].

4.2 RNA 干扰和作物品质改良

通过转基因工程已成功地将RNAi技术用于提高作物对病毒的抗性,转基因抗病毒热带果树番木瓜(*Carica papaya*)是一个成功范例.将编码番木瓜环状病毒W(PRSV-W)衣壳蛋白的反向重复序列转入番木瓜中表达,转基因植物获得对PRSV-W的抗性^[110].Niu等人^[111]研究提示,miRNA途径也能用于改良植物对病毒的抗性.拟南芥miR159的前体经改造后,引入来自芜菁黄花叶病毒(TYMV)和芜菁花叶病毒(TuMV)中基因沉默抑制子p69和HC-Pro的同源序列.同时表达这类人工小RNA的拟南芥对TYMV和TYMV侵染不敏感.一个最新的研究发现,以RISC复合体结合位点为靶位点,利用植物表达人工小

RNA,能显著提高植物对CMV病毒的抗性^[112].这些技术在作物抗多种病毒的基因工程方面有良好的应用前景.

虫害和病害是影响作物产量的重要原因,为此,人们进行了大量研究工作来改良植物对病虫害的抗性.利用基因工程培育抗虫农作物新品种是减轻作物虫害的重要手段.苏云金杆菌毒素对鳞翅目和鞘翅目昆虫非常有效,在转基因植物中被广泛应用.如上所述,Bt蛋白与昆虫中肠的受体相结合,形成孔状结构造成消化道膜的高通透性,最终导致昆虫死亡^[113].然而如同长期使用杀虫剂导致昆虫产生抗性一样,长期种植Bt作物,也会导致田间出现对Bt产生抗性的昆虫^[114],这就需要有新方法来控制虫害.

在昆虫RNAi研究中,一般通过注射方式将dsRNA引入昆虫组织.但注射方式很难将RNAi与田间害虫控制联系起来.1998年,Fire等人^[11]就已报道线虫在取食表达GFP基因的dsRNA的细菌时,可以将dsRNA吸收到体内,通过RNAi的途径抑制线虫中的GFP基因表达.这给dsRNA通过昆虫取食进入中肠细胞行使功能这一假设提供了证据.早期利用RNAi控制虫害的尝试都没有成功^[115],直到2007年,两个独立的实验室分别发表论文,为利用RNAi技术控制虫害提供了有力证据^[92,93].这两个实验室利用转基因植物表达与昆虫基因匹配的dsRNA,通过昆虫取食植物将dsRNA传递到昆虫体内,行使RNAi的功能(图1).棉花含有高浓度棉酚及相关倍半萜醛类,这些成份对昆虫具有普遍毒性.本实验室研究了棉铃虫对棉酚的解毒机制,从棉铃虫中分离到一个P450单加氧酶基因*CYP6AE14*,*CYP6AE14*在棉铃虫中肠高表达并可以被棉酚诱导.为抑制*CYP6AE14*表达,利用转基因植物(拟南芥和烟草)表达了根据*CYP6AE14*序列设计的dsRNA.当棉铃虫进食了这些转基因植物后,中肠中*CYP6AE14*的表达被抑制,导致棉铃虫对棉酚的耐受性降低^[92].另一研究小组^[93]在(*Zea mays* L.)中表达玉米食虫(*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte)V-type ATPase的dsRNA,得到的转基因植物明显提高了对玉米食虫的抗性.这两项研究为利用RNAi研发新一代抗虫转基因作物提供了实验证据.

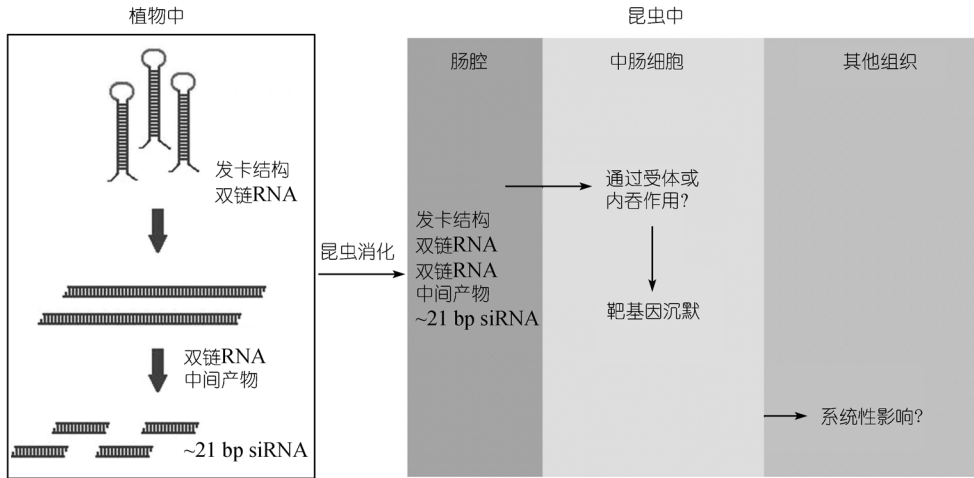


图 1 由转基因植物介导的昆虫 RNAi 示意图

将发夹结构基因转入植物, 在植物中产生发夹RNA(hairpin RNA), 再经过小RNA途径剪切成中间产物——较长的双链RNA(dsRNA), 最后形成小干扰RNA(siRNA)。在dsCYP6AE14转基因植物中, 来自棉铃虫CYP6AE14基因的dsRNA和siRNA都可以检测到^[92]。棉铃虫取食转基因植物后中肠中CYP6AE14基因的表达受到抑制

在转基因植物中, 同时检测到了与CYP6AE14对应的dsRNA和siRNA^[92]。一个重要的问题是究竟哪种形式的RNA分子介导了昆虫RNAi? Dicer活性是从dsRNA前体加工成siRNAs过程中所必需的。与野生型背景相比, 在*dcl2*, *dcl3*, *dcl4* 3突变体中表达CYP6AE14 dsRNA, 会积累大量前体dsRNA。从昆虫饲喂实验来看, Dicer 3突变体背景下的转基因植物能更有效地抑制昆虫体内靶基因表达。一个可能的解释, 是长片段dsRNA在植物介导昆虫RNA中也起重要作用(图1)。然而, 还有许多问题没有解决, 比如谁是真正有效的RNAi信号分子以及RNAi是否能在昆虫组织间扩散和放大。对植物介导昆虫RNAi分子机制认识的深入, 将有助于这一技术在作物保护中的应用。

如前所述, 大量有毒次生代谢化合物的积累是植物一个重要的防御反应。如棉花中的棉酚, 烟草中的咖啡因等。然而这些次生代谢物往往具有普遍毒性, 限制了人们对作物的利用。RNAi技术可通过抑制关键酶的表达, 改变植物的代谢流。*CaMXMT1* 是咖啡因合成途径的N-转甲基酶, 为获得低含量咖啡因的咖啡, Ogita等人^[116]利用RNAi抑制了咖啡树中*CaMXMT1* 的表达, 使咖啡因含量下降了 70%。棉铃

营养成分高但同时含有大量的棉酚及其倍半萜醛类, 其阻碍了人们对棉籽的利用。为降低棉籽中棉酚的含量, 人们利用RNAi的方法, 在棉籽中特异性地表达了与棉酚合成途径中关键酶*cadinene* 合成酶基因相应的dsRNA, 由于棉酚合成途径被有效抑制, 棉籽中的棉酚含量有了显著降低^[117]。

5 展望

近年来, RNAi的机制已被深入研究, 然而还存在许多未知的领域, 需要更多的工作来发现新的小RNA并阐明其生成途径、作用机制以及生物学功能。例如, 曾经认为miRNA对基因的调控需要有一段 21 bp左右严谨互补(一般只允许有 1~2 个碱基错配)的同源RNA, 两个研究小组最新发现仅含 7 个核苷酸的元件就能在翻译水平调控靶基因的表达^[118,119]。最近, 在农业上RNAi技术已发展成为控制虫害、提高作物品质的新方法。与传统转基因手段相比, 这一技术更具选择性和安全性。然而, 植物介导的昆虫RNA干扰机制还不清楚。无疑, 这些研究将继续为生物学、医学和农学研究者所关注。随着对小RNA及基因沉默机制认识的加深, RNAi将会被更广泛地应用于包括作物性状改良在内的生命科学各个领域。

参考文献

- 1 Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391(6669): 806—811 [\[DOI\]](#)
- 2 Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 1990, 2(4): 279—289 [\[DOI\]](#)
- 3 Brusslan J A, Karlin-Neumann G A, Huang L, et al. An *Arabidopsis* mutant with a reduced level of cab140 RNA is a result of cosuppression. *Plant Cell*, 1993, 5(6): 667—677 [\[DOI\]](#)
- 4 Carvalho D F, Gheysen G, Kushnir S, et al. Suppression of beta-1,3-glucanase transgene expression in homozygous plants. *EMBO J*, 1992, 11(7): 2595—2602
- 5 Angenent G C, Franken J, Busscher M, et al. Co-suppression of the petunia homeotic gene *flp2* affects the identity of the generative meristem. *Plant J*, 1994, 5(1): 33—44 [\[DOI\]](#)
- 6 Waterhouse P M, Graham M W, Wang M B. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(23): 13959—13964 [\[DOI\]](#)
- 7 Lindbo J A, Dougherty W G. Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology*, 1992, 189(2): 725—733 [\[DOI\]](#)
- 8 Dalmay T, Hamilton A, Mueller E, et al. Potato virus X amplicons in *Arabidopsis* Mediate genetic and epigenetic gene silencing. *Plant Cell*, 2000, 12(3): 369—380 [\[DOI\]](#)
- 9 Angell S M, Baulcombe D C. Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. *EMBO J*, 1997, 16: 3675—3684 [\[DOI\]](#)
- 10 Li H W, Li W X, Ding S W. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science*, 2002, 296(5571): 1319—1321 [\[DOI\]](#)
- 11 Hamilton A J, Baulcombe D C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 1999, 286(5441): 950—952 [\[DOI\]](#)
- 12 Meins F, Si-Ammour A, Blevins T. RNA silencing systems and their relevance to plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005, 21(1): 297—318 [\[DOI\]](#)
- 13 Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281—297 [\[DOI\]](#)
- 14 Kanno T, Huettel B, Mette M F, et al. Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation. *Nat Genet*, 2005, 37(7): 761—765 [\[DOI\]](#)
- 15 Matzke M A, Birchler J A. RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(1): 24—35 [\[DOI\]](#)
- 16 Almeida R, Allshire R C. RNA silencing and genome regulation. *Trends Cell Biol*, 2005, 15(5): 251—258 [\[DOI\]](#)
- 17 Katiyar-Agarwal S, Morgan R, Dahlbeck D, et al. A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(47): 18002—18007 [\[DOI\]](#)
- 18 Henz S R, Cumbie J S, Kasschau K D, et al. Distinct expression patterns of natural antisense transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2007, 144(3): 1247—1255 [\[DOI\]](#)
- 19 Wu F, Yu L, Cao W, et al. The N-terminal double-stranded RNA binding domains of *Arabidopsis* HYPONASTIC LEAVES1 are sufficient for pre-microRNA processing. *Plant Cell*, 2007, 19(3): 914—925 [\[DOI\]](#)
- 20 Allen E, Xie Z, Gustafson A M, et al. MicroRNA-directed phasing during *trans*-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 2005, 121(2): 207—221 [\[DOI\]](#)
- 21 Girard A, Sachidanandam R, Hannon G J, et al. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*, 2006, 442(7099): 199—202
- 22 Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, et al. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*, 2006, 442(7099): 203—207
- 23 Katiyar-Agarwal S, Gao S, Vivian-Smith A, et al. A novel class of bacteria-induced small RNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 2007, 21(23): 3123—3134 [\[DOI\]](#)
- 24 Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature*, 2004, 431(7006): 356—363 [\[DOI\]](#)
- 25 Elbashir S M, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 2001, 15(2): 188—

- 200[DOI]
- 26 Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75(5): 843—854[DOI]
- 27 Reinhart B J, Weinstein E G, Rhoades M W, et al. MicroRNAs in plants. *Genes Dev*, 2002, 16(13): 1616—1626[DOI]
- 28 Lee R C, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001, 294(5543): 862—864[DOI]
- 29 Lau N C, Lim L P, Weinstein E G, et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001, 294(5543): 858—862[DOI]
- 30 Xie Z X, Johansen L K, Gustafson A M, et al. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biology*, 2004, 2(5): e104[DOI]
- 31 Beclin C, Boutet S, Waterhouse P, et al. A branched pathway for transgene-induced RNA silencing in plants. *Curr Biol*, 2002, 12(8): 684—688[DOI]
- 32 Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, et al. An RNA dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*, 2000, 101(5): 543—553[DOI]
- 33 Kurihara Y, Watanabe Y. *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(34): 12753—12758[DOI]
- 34 Hannon G J. RNA interference. *Nature*, 2002, 418(6894): 244—251[DOI]
- 35 Chan S W L, Zilberman D, Xie Z, et al. RNA silencing genes control de novo DNA methylation. *Science*, 2004, 303(5662): 1336—1341[DOI]
- 36 Schauer S E, Jacobsen S E, Meinke D W, et al. DICER-LIKE1: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(11): 487—491[DOI]
- 37 Ding S W, Voinnet O. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, 2007, 130: 413—426[DOI]
- 38 Carmell M A, Xuan Z, Zhang M Q, et al. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance and tumorigenesis. *Genes Dev*, 2002, 16(21): 2733—2742[DOI]
- 39 Song J J, Joshua-Tor L. Argonaute and RNA-getting into the groove. *Curr Opin Struct Biol*, 2006, 16(1): 5—11[DOI]
- 40 Song J J, Liu J d, Tolia N H, et al. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Mol Biol*, 2003, 10(12): 1026—1032[DOI]
- 41 Lingel A, Simon B, Izaurralde E, et al. Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature*, 2003, 426(6965): 465—469[DOI]
- 42 Song J J, Smith S K, Hannon G J, et al. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 2004, 305(5689): 1434—1437[DOI]
- 43 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[DOI]
- 44 Qi Y J, He X Y, Wang X J, et al. Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, 2006, 443(7114): 1008—1012[DOI]
- 45 Zheng X W, Zhu J H, Kapoor A, et al. Role of *Arabidopsis* AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *EMBO J*, 2007, 26: 1691—1701[DOI]
- 46 Vazquez F, Vaucheret H, Rajagopalan R, et al. Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs. *Mol Cell*, 2004, 16(1): 69—79[DOI]
- 47 Fahlgren N, Montgomery T A, Howell M D, et al. Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA affects developmental timing and patterning in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2006, 16(9): 939—944[DOI]
- 48 Mi S J, Cai T, Hu Y G, et al. Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell*, 2008, 133(1): 116—127
- 49 Chen X M, Liu J, Cheng Y L, et al. HEN1 functions pleiotropically in *Arabidopsis* development and acts in C function in the flower. *Development*, 2002, 129(5): 1085—1094
- 50 Bollman K M, Aukerman M J, Park M Y, et al. HASTY, the *Arabidopsis* ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis. *Development*, 2003, 130(8): 1493—1504[DOI]
- 51 Palauqui J C, Elmayan T, de Borne F D, et al. Frequencies, timing and spatial patterns of co-suppression of nitrate reductase and nitrite reductase in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol*, 1996, 112(4): 1447—1456

- 52 Palauqui J C, Vaucheret H. Field trial analysis of nitrate reductase co-suppression: a comparative study of 38 combinations of transgene loci. *Plant Mol Biol*, 1995, 29(1): 149—159[DOI]
- 53 Dunoyer P, Himber C, Voinnet O. DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nat Genet*, 2005, 37(12): 1356—1360[DOI]
- 54 Voinnet O, Baulcombe D C. Systemic signalling in gene silencing. *Nature*, 1997, 389(6651): 553
- 55 Patrice C, Sabrina L, Victor A I, et al. Graft transmission of induced and spontaneous post-transcriptional silencing of chitinase genes. *Plant J*, 2001, 28(5): 493—501[DOI]
- 56 Voinnet O, Vain P, Angell S, et al. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell*, 1998, 95(2): 177—187[DOI]
- 57 Dunoyer P, Himber C, Ruiz-Ferrer V, et al. Intra- and intercellular RNA interference in *Arabidopsis thaliana* requires components of the microRNA and heterochromatic silencing pathways. *Nat Genet*, 2007, 39(7): 848—856[DOI]
- 58 Brosnan C A, Mitter N, Christie M, et al. Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(37): 14741—14746[DOI]
- 59 Smith L M, Pontes O, Searle I, et al. An SNF2 protein associated with nuclear RNA silencing and the spread of a silencing signal between cells in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2007, 19(5): 1507—1521[DOI]
- 60 Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 1998, 395(6705): 854[DOI]
- 61 Tabara H, Grishok A, Mello C C. RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science*, 1998, 282(5388): 430—431[DOI]
- 62 Winston W M, Molodowitch C, Hunter C P. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*, 2002, 295(5564): 2456—2459[DOI]
- 63 Saleh M C, van Rij R P, Hekele A, et al. The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(8): 793—802[DOI]
- 64 Winston W M, Sutherlin M, Wright A J, et al. *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(25): 10565—10570[DOI]
- 65 Sijen T, Steiner F A, Thijssen K L, et al. Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. *Science*, 2007, 315(5809): 244—247[DOI]
- 66 Sijen T, Fleenor J, Simmer F, et al. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, 2001, 107(4): 465—476[DOI]
- 67 Smardon A, Spoerke J M, Stacey S C, et al. EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr Biol*, 2000, 10(4): 169—178[DOI]
- 68 Tomoyasu Y, Miller S, Tomita S, et al. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biol*, 2008, 9(1): R10[DOI]
- 69 Richards S, Gibbs R A, Weinstock G M, et al. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, 2008, 452(7190): 949—955[DOI]
- 70 Brennecke J, Hipfner D R, Stark A, et al. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the pro-apoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*, 2003, 113(1): 25—36[DOI]
- 71 Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 19—53[DOI]
- 72 Wang J W, Wang L J, Mao Y B, et al. Control of root cap formation by MicroRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2005, 17(8): 2204—2216[DOI]
- 73 Li H, Xu L, Wang H, et al. The putative RNA-dependent RNA polymerase RDR6 acts synergistically with ASYMMETRIC LEAVES1 and 2 to repress BREVIPEDICELLUS and microRNA165/166 in *Arabidopsis* leaf development. *Plant Cell*, 2005, 17(8): 2157—2171[DOI]
- 74 Baurle I, Smith L, Baulcombe D C, et al. Widespread role for the flowering-time regulators FCA and FPA in RNA-mediated chromatin silencing. *Science*, 2007, 318(5847): 109—112[DOI]
- 75 Liu B, Chen Z, Song X, et al. *Oryza sativa* dicer-like4 reveals a key role for small interfering RNA silencing in plant development. *Plant Cell*, 2007, 19(9): 2705—2718[DOI]
- 76 Ding S W, Li H W, Lu R, et al. RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus Res*, 2004, 102(1): 109—115[DOI]

- 77 Lindbo J A, Silva-Rosales L, Proebsting W M, et al. Induction of highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell*, 1993, 5(12): 1749—1759[DOI]
- 78 Waterhouse P M, Smith N A, Wang M B. Virus resistance and gene silencing: killing the messenger. *Trends Plant Sci*, 1999, 4(11): 452—457[DOI]
- 79 Pinto Y M, Kok R A, Baulcombe D C. Resistance to rice yellow mottle virus (RYMV) in cultivated African rice varieties containing RYMV transgenes. *Nat Biotech*, 1999, 17(7): 702—707[DOI]
- 80 Qu F, Morris T J. Suppressors of RNA silencing encoded by plant viruses and their role in viral infections. *FEBS Letters*, 2005, 579(26): 5958—5964[DOI]
- 81 Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, et al. Hierarchical action and inhibition of plant dicer-like proteins in antiviral defense. *Science*, 2006, 313(5783): 68—71[DOI]
- 82 Dunoyer P, Himber C, Voinnet O. Induction, suppression and requirement of RNA silencing pathways in virulent *Agrobacterium tumefaciens* infections. *Nat Genet*, 2006, 38(2): 258—263[DOI]
- 83 Navarro L, Dunoyer P, Jay F, et al. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, 2006, 312(5772): 436—439[DOI]
- 84 Navarro L, Jay F, Nomura K, et al. Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science*, 2008, 321(5891): 964—967[DOI]
- 85 Hammond S M. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Letters*, 2005, 579(26): 5822—5829[DOI]
- 86 Pedersen I M, Cheng G, Wieland S, et al. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature*, 2007, 449(7164): 919—922[DOI]
- 87 Sunkar R, Zhu J K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2004, 16(8): 2001—2019[DOI]
- 88 Sunkar R, Kapoor A, Zhu J K. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell*, 2006, 18(8): 2051—2065[DOI]
- 89 Borsani O, Zhu J, Verslues P E, et al. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell*, 2005, 123(7): 1279—1291[DOI]
- 90 Wittstock U, Gershenzon J. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5(4): 300—307[DOI]
- 91 Pandey S P, Shahi P, Gase K, et al. Herbivory-induced changes in the small-RNA transcriptome and phytohormone signaling in *Nicotiana attenuata*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(12): 4559—4564[DOI]
- 92 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. *Nat Biotech*, 2007, 25(11): 1307—1313[DOI]
- 93 Baum J A, Bogaert T, Clinton W, et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat Biotech*, 2007, 25(11): 1322—1326[DOI]
- 94 Lu C, Tej S S, Luo S, et al. Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. *Science*, 2005, 309(5740): 1567—1569[DOI]
- 95 Wang J F, Zhou H, Chen Y Q, et al. Identification of 20 microRNAs from *Oryza sativa*. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(5): 1688—1695[DOI]
- 96 Liang R Q, Li W, Li Y, et al. An oligonucleotide microarray for microRNA expression analysis based on labeling RNA with quantum dot and nanogold probe. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(2): e17[DOI]
- 97 Sunkar R, Zhou X F, Zheng Y, et al. Identification of novel and candidate miRNAs in rice by high throughput sequencing. *BMC Plant Biol*, 2008, 8(1): 25[DOI]
- 98 Wang L, Wang M B, Tu J X, et al. Cloning and characterization of microRNAs from *Brassica napus*. *FEBS Lett*, 2007, 581(20): 3848—3856[DOI]
- 99 He X F, Fang Y Y, Feng L, et al. Characterization of conserved and novel microRNAs and their targets, including a TuMV-induced TIR-NBS-LRR class R gene-derived novel miRNA in Brassica. *FEBS Lett*, 2008, 582(16): 2445—2452[DOI]
- 100 Clemens J C, Worby C A, Simonson-Leff N, et al. Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6499—6503[DOI]

- 101 Baulcombe D C. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr Opin Plant Biol*, 1999, 2(2): 109—113[DOI]
- 102 Tuttle J R, Idris A M, Brown J K, et al. Geminivirus-mediated gene silencing from Cotton leaf crumple virus is enhanced by low temperature in cotton. *Plant Physiol*, 2008, 148(1): 41—50[DOI]
- 103 Nagamatsu A, Masuta C, Senda M, et al. Functional analysis of soybean genes involved in flavonoid biosynthesis by virus-induced gene silencing. *Plant Biotech J*, 2007, 5(6): 778—790[DOI]
- 104 Rajagopal R, Sivakumar S, Agrawal N, et al. Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *J Biol Chem*, 2002, 277(49): 46849—46851[DOI]
- 105 Torrie L S, Radford J C, Southall T D, et al. Resolution of the insect ouabain paradox. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(37): 13689—13693[DOI]
- 106 Zhao M, Soderhall I, Park J W, et al. A novel 43-kDa protein as a negative regulatory component of phenoloxidase-induced melanin synthesis. *J Biol Chem*, 2005, 280(26): 24744—24751[DOI]
- 107 Fraser A G, Kamath R S, Zipperlen P, et al. Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome by systematic RNA interference. *Nature*, 2000, 408(6810): 325—330[DOI]
- 108 Gonczy P, Echeverri C, Oegema K, et al. Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome . *Nature*, 2000, 408(6810): 331—336[DOI]
- 109 Kamath R S, Fraser A G, Dong Y, et al. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*, 2003, 421(6920): 231—237[DOI]
- 110 Krubphachaya P, Juricek M, Kertbundit S. Induction of RNA-mediated resistance to papaya ringspot virus type W. *J Biochem Mol Biol*, 2007, 40(3): 404—411
- 111 Niu Q W, Lin S S, Reyes J L, et al. Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(11): 1420—1428[DOI]
- 112 Duan C G, Wang C H, Fang R X, et al. Artificial microRNAs highly accessible to targets confer efficient virus resistance in plants. *J Virol*, 2008, 82(22): 11084—11095[DOI]
- 113 Bravo A, Gill S S, Soberon M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 2007, 49(4): 423—435[DOI]
- 114 Gahan L J, Gould F, Heckel D G. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*, 2001, 293(5531): 857—860[DOI]
- 115 Gordon K H, Waterhouse P M. RNAi for insect-proof plants. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(11): 1231—1232[DOI]
- 116 Ogita S, Uefuji H, Yamaguchi Y, et al. Producing decaffeinated coffee plants. *Nature*, 2003, 423(6942): 823[DOI]
- 117 Sunilkumar G, Campbell L M, Puckhaber L, et al. Engineering cottonseed for use in human nutrition by tissue-specific reduction of toxic gossypol. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(48): 18054—18059[DOI]
- 118 Selbach M, Schwanhauser B, Thierfelder N, et al. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 2008, 455(7209): 58—63[DOI]
- 119 Baek D, Villen J, Shin C, et al. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 2008, 455(7209): 64—71[DOI]