

寄主诱导的基因沉默技术研究和应用进展

肖 瑶^{1,2} 王教瑜^{2*} 李 玲¹ 王艳丽² 张传清¹ 孙国昌^{2*}

(1. 浙江农林大学农业与食品科学学院, 临安 311300; 2. 浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所, 省部共建农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室, 杭州 310021)

摘要: 病原真菌严重威胁着农作物的产量和品质, 提高作物抗性是病原真菌病害防控的重要措施。寄主诱导的基因沉默(host induced gene silencing, HIGS)技术是在RNA干扰的基础上发展而来, 以病原真菌生长发育和侵染过程中的关键基因为靶标, 通过在寄主植物中表达这些基因的干扰RNA从而抑制病原真菌中靶标基因的表达, 达到抵制病原真菌扩展, 提高寄主植物抗病性的目的。近年来, HIGS技术被用于防控多种由病原真菌引起的病害, 并取得了明显成效, 为植物抗病资源的开发及应用提供了新途径。本文综述了HIGS技术的原理、技术路线、操作方法和国内外的主要研究进展, 总结了操作中需要注意的事项, 并对该技术的发展趋势和应用前景进行了展望。

关键词: 病原真菌; RNA干扰; 寄主诱导的基因沉默

Advances in the researches and applications of host-induced gene silencing technology

XIAO Yao^{1,2} WANG Jiaoyu^{2*} LI Ling¹ WANG Yanli² ZHANG Chuanqing¹ SUN Guochang^{2*}

(1. School of Agricultural and Food Sciences, Zhejiang Agricultural and Forestry University, Lin'an 311300, Zhejiang Province, China; 2. State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-products, Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, Zhejiang Province, China)

Abstract: Pathogenic fungi seriously threaten the output and quality of crops, and improving crop resistance is an important measure for the prevention and control of pathogenic fungi. Host-induced gene silencing (HIGS) technology was developed based on RNA interference, which targeted the key genes in the growth and development and the infection process of pathogenic fungi by expressing the interfering RNAs in host plants to inhibit the expression of target genes in pathogenic fungi and improve the disease resistance in the host plants. In recent years, HIGS technology has been used to prevent and control a variety of diseases caused by pathogenic fungi and achieved significant results, providing a new way for the development and application of plant disease-resistant resources. This review summarized the principles, technical routes, operation methods and main progresses in HIGS technology at home and abroad, summarized the issues that should be paid attention to during operation, and predicted the prospects in the development and application of the technology.

Key words: plant fungal disease; RNA interference; host-induced gene silencing

病原真菌可导致植物组织坏死、腐烂或萎蔫等, 严重威胁农作物的生长, 影响农产品的产量和品质。据推算, 全球水稻每年因病原真菌所造成的产

量损失可达10%~50%(Talbot, 2003)。除了导致作物产量和品质的下降, 多种病原真菌还会产生毒素, 对食用农产品的人畜产生毒害(朱旗等, 2003; 王春

基金项目: 浙江省重点研发计划(2019C02010), 国家自然科学基金(31470249), 国家重点研发计划(2016YFD0300707)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: wangjiaoyu78@sina.com, sungc01@sina.com

收稿日期: 2019-04-05

红等,2009)。据联合国粮农组织统计,全球每年有25%农产品受到病原真菌毒素污染,给人畜带来巨大的安全隐患。培育和种植抗性品种是抵抗病原真菌侵染的有效措施,但病原真菌的不断变异和新致病小种的不断出现致使抗性品种种植3~5年便会丧失抗性,给抗病育种带来了巨大的挑战。

随着生物技术的快速发展,基因改良在抗病作物培育中应用越来越多。寄主诱导的基因沉默(host induced gene silencing, HIGS)技术起初被用于植物-病原真菌的互作研究中(Dean et al., 2005),如今其作为新型的基因调控技术,在抗性品种培育、产量提高及病害防控中被应用得越来越多。本研究对HIGS技术的原理、技术路线、操作方法和国内外的主要研究进展进行综述,总结操作过程中的注意事项,并对该技术的发展趋势和应用前景进行展望,以期对HIGS技术的相关研究提供理论参考。

1 HIGS技术的原理

HIGS技术的基础是RNA干扰(RNA interference, RNAi), RNAi是近20年来基因功能研究中最重要发现之一(Sharp, 2001),是真核生物中普遍存在的一种基因调控方式,具有重要的生物学功能(Carthew, 2001; Ketting, 2011)。在真核细胞内,外源或内源的双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)或RNA形成的发夹结构被Dicer酶识别并切割成21~25 nt的小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA), siRNA能够识别细胞内同源的目的基因信使RNA(messenger RNA, mRNA),并对其进行切割,从而干扰目的基因的表达。因此,在真核细胞内表达目的基因的dsRNA,或者将体外表达或合成的dsRNA或siRNA导入真核细胞,都有可能对目的基因进行沉默(Elbashir et al., 2001)。目前RNAi已成为大多数蠕虫(Calo et al., 2012)、原生生物(Nicolas et al., 2010)、动物(Cervantes et al., 2013; Torres-Martínez & Ruiz-Vázquez, 2016)和植物(Lee et al., 2009; 2010)真核生物基因功能研究的重要工具。

同样如果在寄主植物细胞内表达靶向病原真菌基因的dsRNA,就有可能实现对病原真菌基因的RNAi,从而抵抗病原真菌的生长与扩展, HIGS技术正是基于这点发展起来的。植物病原真菌的大部分基因与寄主植物的基因不存在序列同源性,使得在寄主植物细胞内对病原真菌基因进行RNAi有了可能。HIGS技术以病原真菌生长发育和侵染致病过

程所需的重要基因为靶点,通过在寄主植物中表达与病原真菌中靶基因序列互补的RNA分子,再经植物细胞加工形成siRNA。当病原真菌侵染植物时,寄主植物能够将siRNA传递到病原真菌的细胞中,特异性地识别病原真菌靶基因的mRNA,导致其降解,干扰靶基因的转录和翻译,从而影响病原真菌的生长发育,延缓其扩展,降低发病程度。细胞中表达的siRNA可以在RNA聚合酶的作用下不断扩增,也可以以靶基因mRNA为模板,合成新的dsRNA,经Dicer酶切割形成新的siRNA,这样反复循环,使细胞中的siRNA分子不断增多, RNAi效应不断增强(Wassenegger & Krczal, 2006; Melnyk et al., 2011),从而实现寄主植物抗病的目的。

2 HIGS技术在作物抗病中的应用

作为一种新兴的抗病策略, HIGS技术已在小麦、大麦、棉花、水稻等多种作物的抗病研究和实践中得到应用(Nunus & Dean, 2012; Ghag, 2017a, b)。

2.1 HIGS技术在小麦上的研究与应用

HIGS技术在小麦上的研究和应用最多。HIGS技术首次被Nowara et al.(2010)提出和应用,将可以表达小麦白粉菌*Blumeria graminis*效应子*Avra10*基因dsRNA的载体导入到不含抗性基因*Mla10*的小麦品种中,在该转基因小麦上,侵染的小麦白粉菌吸器减少,菌丝生长受到抑制,对白粉病的抗性提高。Stärkel(2011)利用农杆菌介导法将小麦赤霉病菌*Fusarium graminearum*脂肪酶I基因的RNAi结构导入到二穗短柄草中,得到了抗赤霉病的转基因植株。Chen et al.(2016)将黄色镰刀菌*F. culmorum*脂肪酶基因*FcFgl1*、 β -1,3-葡聚糖合酶基因*FcGls1*、促分裂素原活化蛋白激酶基因*FcFmk1*、几丁质合酶5基因*FcChsV*的RNA发卡结构分别导入小麦中,该转基因小麦对黄色镰刀菌的抗性提高。Yin et al.(2011)研发了一套验证小麦条锈菌*Puccinia striiformis*基因功能的HIGS系统,并利用该系统有效地沉默了小麦条锈菌的几丁质酶、己糖转运蛋白等6个基因。Panwar et al.(2013a, b)利用大麦条纹花叶病毒介导的基因沉默体系(barley stripe mosaic virus-induced gene silencing, BSMV-VIGS)将含有叶锈菌*P. triticina*促分裂素原活化蛋白激酶基因 Pt -MAPK1、亲环蛋白基因 Pt CYCL1、钙依赖磷酸酶B基因 Pt CNB片段的发夹结构转染小麦叶片后,小麦叶片上叶锈菌产生的孢子量减少,病症减轻,同时对应的叶锈菌靶基因表达水平下调。此外,在以小麦条

锈菌 *PsCPK1* 基因为靶基因进行 HIGS 后得到的转基因小麦叶片上,病原真菌侵染菌丝的长度明显降低,病害症状明显减少,并且转基因小麦的第3、4代株系依然对条锈菌表现高抗病性(Tuo et al., 2018)。

2.2 HIGS技术在大麦上的研究与应用

继小麦之后,学者在大麦上也开展了 HIGS 技术的研究。Koch & Kogel(2014)针对禾谷镰刀菌 *F. graminearum* *CYP51A*、*CYP51B* 和 *CYP51C* 三个基因设计了 RNAi 结构并在大麦中表达,得到的转基因大麦对禾谷镰刀菌的生长和发育有显著的抑制作用。Zhang et al.(2012)通过 BSMV-VIGS 瞬时表达体系干扰大麦上条锈菌钙依赖磷酸酶亚基 *PsCNA1* 和 *PsCNB1* 基因的表达,可有效减少病原真菌产孢量,延缓菌丝扩展。Zhao et al.(2014)将以轮枝镰孢菌 *F. verticillioide* *CYP51* 基因为靶标的 dsRNA 导入到大麦后,该转基因大麦对轮枝镰孢菌的抗性大大提高。此外,Pliego et al.(2013)还利用 HIGS 单细胞分析技术从大麦中筛选出了 8 个可干扰大麦白粉病菌 *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* 侵染的效应子。

2.3 HIGS技术在水稻上的研究与应用

在水稻上 HIGS 技术研究开展得相对较晚。王梦颖等(2015)首次尝试在水稻中转入稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae* 致病相关基因的干扰片段,建立了水稻抗稻瘟病研究的 HIGS 体系。唐喆等(2018)利用 Gateway 技术构建 HIGS 表达载体,以对稻瘟病菌分生孢子萌发有重要作用的 *RHO1* 基因为靶基因,将 dsRNA 导入日本晴水稻品种中,得到抗稻瘟病菌的转基因水稻。Zhu et al.(2017)利用 HIGS 技术沉默稻瘟病菌 *MoABC1*、*MoMAC1* 和 *MoPMK1* 三个基因后,转基因水稻植株上稻瘟病菌靶基因的转录水平与稻瘟病的严重度均受到显著抑制。赵美等(2017)筛选了在水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani* 感染水稻初期高表达、产物具有水解酶活性、碳氧裂解酶活性或转移酶活性的 5 个候选基因,构建了 HIGS 载体,获得了转基因水稻并得到了稳定的转基因水稻后代。本课题组以过氧化物酶形成的 *PEX* 基因等关键基因为靶标构建了 HIGS 载体,导入到水稻中,获得了抗稻瘟病的转基因水稻(待发表)。

2.4 HIGS技术在其它作物上的研究和应用

Stärkel(2011)以甜菜褐斑病菌 *Cercospora beticola* 毒素合成相关的氧甲基转移酶基因 *CTB2* 为靶基因构建 HIGS 载体,并转入到甜菜中,接种鉴定结果表明该转基因甜菜对褐斑病菌的抗性显著提高。Govindarajulu et al.(2015)以莴苣盘梗霉 *Bremia*

lactucae 的 *HAM34* 和 *CES1* 基因为靶基因构建 HIGS 载体,利用农杆菌介导法将其导入到莴苣中,培育出可沉默的 *HAM34* 和 *CES1* 基因的转基因莴苣,该转基因莴苣可抑制霜霉病菌的生长和孢子形成。Ghag et al.(2014)在香蕉中分别表达以香蕉萎蔫病菌 *F. oxysporum* *Velvet* 基因和 *Ftfl* 基因为沉默靶点的 HIGS 载体,能有效地增强香蕉抗萎蔫病的能力。Zhang et al.(2016)以黄萎病菌 *Verticillium dahliae* 疏水蛋白基因 *VDHI* 为靶标构建出能够沉默 *VDHI* 基因的转基因棉花,该转基因棉花对黄萎病表现高抗病性。此外,在拟南芥和番茄中,Wang et al.(2016)利用 HIGS 技术沉默灰霉菌 *Botrytis cinerea* 的 *DCL* 基因后,灰霉菌在转基因植物上的生长和致病性大大降低。谭成龙等(2017)以禾谷镰刀菌的分泌蛋白基因和激酶基因为靶基因构建的 HIGS 载体,通过农杆菌介导法将其转入到二穗短柄草后,转基因植株对禾谷镰刀菌的抗性明显增强。

3 HIGS技术流程

3.1 选择目的基因

靶基因的选择是 HIGS 技术成功的关键。首先可选择对靶标植物病原真菌生长发育至关重要的基因作为靶基因,如细胞色素基因 *CYP51*、微管蛋白基因 *β -tublin* 等,这些基因一旦被下调,将对病原真菌生长产生较大影响;其次可选择在病原真菌致病过程中起关键作用的基因,如 *MAPK* 基因、毒素合成基因等,这些基因的选择增加了对致病过程的针对性;另外还可以选择病原真菌特异的基因,如疏水蛋白基因、几丁质酶基因等,这些基因能够减少 HIGS 载体对转基因植物的潜在影响,如赵美等(2017)从水稻纹枯病菌互作的基因库中找出 15 个初选基因,通过功能富集(GO 分析、KOG 分析)及基因表达趋势分析(short time-series expression miner, STEM)最后确定了 5 个候选靶基因。

除选择高效特异的病原真菌基因外,RNAi 区段的靶基因选择也关系着 HIGS 技术的成败。对于非专性寄生菌,可以利用基因敲除结合病原真菌体内或体外的 RNAi 干扰试验鉴定筛选靶基因和用于 HIGS 技术的干扰片段(程伟,2015)。对于无法体外培养的专性寄生菌,在筛选目标靶基因时,可利用单细胞分析技术或 BSMV-VIGS 瞬时表达体系。

3.2 构建 HIGS 载体

为避免潜在的 RNAi 脱靶造成的负面影响,构建载体前需要对目的基因进行 RNAi 脱靶预测。可

利用 BLASTn (Altschul et al., 1997) 或 SI-FI (<http://www.snowformatics.com/si-fi.html>) 等生物软件筛选出特异性高、干扰效率显著的序列。

HIGS 构建方式很多, 包括对单个靶基因沉默和对多个靶基因沉默。对于确定的单个靶基因, 可针对单个靶基因构建单个 HIGS 载体转化植物, 或针对单个靶基因的不同区段构建多个不同的 HIGS 载体共同转化植物, 或将不同区段构建在同一个 HIGS 载体中转化植物。对于确定的多个靶基因, 针对不同的靶基因构建不同的 HIGS 载体共同转化, 或构建 1 个携带多个靶基因序列的 HIGS 载体, 同时沉默多个靶基因。理论上, 上述构建方式均能实现靶基因的沉默。在已有的报道中, 学者采用的 HIGS 构建方式也不尽相同, 目前没有证据表明某种构建方式更有优势 (程伟等, 2017)。

3.3 转基因水稻的获得与鉴定

将病原真菌靶基因 RNAi 片段导入到寄主植物中的常用方式有借助病毒载体系统、基因枪轰击法、聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 介导转化法、电击穿孔法和农杆菌介导法 (张河山等, 2013)。常借助病毒载体系统为 BSMV-VIGS。基因枪轰击法: 利用基因枪直接将靶基因 RNAi 片段导入到寄主细胞、未成熟胚或愈伤组织中。PEG 介导转化法: 制备植物细胞的原生质体, 利用 PEG 介导转化使外源 HIGS 载体进入到制备的植物细胞原生质体内。电击穿孔法: 利用高压电脉冲的电击穿孔作用将 HIGS 载体导入到植物原生质体内。农杆菌介导法: 无需制备原生质体, 借助农杆菌对植物愈伤组织的侵染实现靶序列向寄主植物的转移与整合, 拟南芥、水稻、大豆、小麦等植物均能利用农杆菌介导法进行高效和稳定的转化。目前 BSMV-VIGS 和农杆菌介导法是 HIGS 技术中应用最多的 2 种方法。

对于获得的 HIGS 转基因植物, 可以采用 PCR 扩增、Southern 杂交等技术进行鉴定, 也可通过将荧光标记在 HIGS 载体上进行荧光观察或利用 Northern 杂交、定量 PCR 及 siRNA 转录组测序分析技术进行检测, 并鉴定 HIGS 转基因植物体内是否形成特异 siRNA 分子。

3.4 转基因植株抗病性分析

HIGS 介导的转基因作物对病原真菌的抗性是否提升, 需要通过严格的抗病性分析。随机选取 5~10 株生长状况基本一致的转基因植株, 采取苗期喷洒、叶片接种、茎部接种、根部接种等多种方式将病原真菌孢子或菌丝分别接种到野生型植株和转基因

植株上, 对野生型植株和转基因植株的发病情况和发病过程进行全面的比较和分析, 包括发病时间、病斑数量、病斑大小、扩展速度以及病害严重度和病情指数等。同时, 可利用光学显微镜或透射电镜观察病原真菌菌丝的侵染状况, 并通过定量 PCR 对植物组织中病原真菌的生物量进行检测, 并进行比较分析。

4 HIGS 技术应用中的注意事项

作为一项新兴的手段, HIGS 技术还处于研究和利用的初期阶段, 尚存在多种待完善之处, 其机制还需要进一步深入研究。例如, 在实施过程中, 并非所有靶基因的都能够被 HIGS 技术下调, 也并非任何靶基因的表达水平下调都会使植物产生抗病表型发生改变, 不同作物甚至同种作物的不同转基因植株所产生的干涉效果和抗性表现均差异较大。而且, 目前尚没有公认的对照基因用于验证 HIGS 技术。因此, 要找到最佳的靶基因还需要大量的前期试验和不断尝试。在鉴定转基因植物时, 应特别注意避免假阳性植株, 需要同时使用分子鉴定、抗性分析等多种方法充分验证。转基因植株某些表型的改变, 有时可能是因为 HIGS 载体被随机插入到寄主的某个关键基因内造成的 (Nakayashiki, 2005)。目前对 HIGS 技术靶基因的选择、干扰片段的长度仍无统一的标准, 但普遍认为靶基因片段不宜过长, 这样既可以保证试验过程的顺利进行, 同时也最大限度地避免非靶基因被沉默的可能性 (Nakayashiki & Nguyen, 2008)。

5 展望

病原真菌造成的农作物病害约占病害种类的 70%~80%, 给农业生产和农产品贮藏造成了不可估量的损失。长期以来, 国内外学者通过杂交育种、分子标记、转抗性基因等多种方法来改善作物的抗病性, 但这些方法大多周期长、工作量大、见效慢, 并且植物转基因往往存在基因表达效率低、基因沉默、基因功能发生改变等复杂情况, 导致抗性基因导入后无效或抗性表型被掩盖。HIGS 技术利用基因干扰现象, 在植物体内对病原真菌的基因进行沉默, 从而提高作物的抗病性。HIGS 技术只需要在寄主体内转录产生 dsRNA, 不需要表达蛋白, 因此避免了传统转基因在目的蛋白表达过程中遇到的问题, 具有较大的优势和发展空间。随着研究的不断深入, 还在病原真菌中发现了一种新的遗传资源非编码

RNA (non-coding RNA, ncRNA), 此类 RNA 不行使编码蛋白质的功能, 却是病原真菌生存和调节基因表达所必须的分子。如 Franco-Zorrilla et al. (2007) 与 Meng et al. (2012) 成功利用目标模拟技术以病原真菌中特异的 ncRNA 为靶点, 干扰正常的功能, 引起病原真菌功能紊乱, 为 HIGS 技术中靶基因的选择提供新思路。此外, HIGS 除在植物体内起作用外, 最近的研究发现在植物体表施用靶基因合成的 dsRNA 或 siRNA, 同样有防治病害的效果 (Weiberg et al., 2013), 该研究结果可为基于 HIGS 技术研究新型杀菌剂的研发及应用提供参考。

HIGS 技术的实现表明寄主植物产生的沉默信号分子可以从植物中转移到病原真菌中, 并抑制相应基因在病原真菌中的转录, 但这些信号分子从植物进入病原真菌的机制尚不清楚。目前的证据仍无法表明不同 HIGS 技术表达系统是否都能够产生足够的沉默信号分子, 并转移到病原真菌中。HIGS 技术不适合防控卵菌病害, 因为卵菌缺少摄入足够体外 DNA 片段的能力, 摄入的沉默片段不足以激发卵菌基因沉默 (Zhang et al., 2011), 此外其它类型的病原真菌是否能够有效地被 HIGS 系统沉默, 也无充分证据。尽管如此, 针对水稻稻瘟病 (王梦颖等, 2015)、小麦条锈病 (Yin et al., 2011)、棉花黄萎病 (刘刚, 2016) 等重要作物的重要病害, 以基因功能研究或抗病作物培育为目的的 HIGS 体系已成功建立。通过对目标基因的充分选择, 可以有效避免 dsRNA 和相应的 siRNA 的非靶效应, 将其对非目标寄主、哺乳动物和寄主植物生理的不良影响降到很小 (刘友梅等, 2017)。通过不断的探究和尝试, HIGS 技术在基础研究和创制抗病作物新种质上的应用将有越来越广阔的前景 (Nunus & Dean, 2012)。

参 考 文 献 (References)

- ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHÄFFER AA, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W, LIPMAN DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17): 3389–3402
- CALO S, NICOLÁS FE, VILA A, TORRES-MARTÍNEZ S, RUIZ-VÁZQUEZ RM. 2012. Two distinct RNA-dependent RNA polymerases are required for initiation and amplification of RNA silencing in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Molecular Microbiology*, 83(2): 379–394
- CARTHEW RW. 2001. Gene silencing by double-stranded RNA. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(2): 244–248
- CERVANTES M, VILA A, NICOLÁS FE, MOXON S, DE HARO JP, DALMAY T, TORRES-MARTÍNEZ S, RUIZ-VÁZQUEZ RM. 2013. A single argonaute gene participates in exogenous and endogenous RNAi and controls cellular functions in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *PLoS ONE*, 8(7): e69283
- CHEN W, KASTNER C, NOWARA D, OLIVEIRA-GARCIA E, RUTTEN T, ZHAO Y, DEISING HB, KUMLEHN J, SCHWEIZER P. 2016. Host-induced silencing of *Fusarium culmorum* genes protects wheat from infection. *Journal of Experimental Botany*, 67(17): 4979–4991
- CHENG W. 2015. Generation of transgenic wheat plants expressing defense-related genes and analysis of their resistance to *Fusarium head blight*. Ph. D Thesis. Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese) [程伟. 2015. 抗赤霉病相关基因转化小麦及其抗病性分析. 博士学位论文. 武汉: 华中农业大学]
- CHENG W, LI HP, HE SL, LIAO YC. 2017. Progress in enhancement of plant resistance against fungal diseases through host-induced gene silencing. *Acta Agronomica Sinica*, 43(8): 1115–1121 (in Chinese) [程伟, 李和平, 何水林, 廖玉才. 2017. 寄主诱导的基因沉默提高植物真菌病害抗性研究进展. 作物学报, 43(8): 1115–1121]
- DEAN RA, TALBOT NJ, EBBOLE DJ, FARMAN ML, MITCHELL TK, ORBACH MJ, THON M, KULKARNI R, XU JR, PAN H, et al. 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*, 434(7036): 980–986
- ELBASHIR SM, HARBORTH J, LENDECKEL W, YALCIN A, WEBER K, TUSCHL T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411(6836): 494–498
- FRANCO-ZORRILLA JM, VALLI A, TODESCO M, MATEOS I, PUGA MI, RUBIO-SOMOZA I, LEYVA A, WEIGEL D, GARCÍA JA, PAZ-ARES J. 2007. Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature Genetics*, 39(8): 1033–1037
- GHAG SB. 2017a. Host induced gene silencing, an emerging science to engineer crop resistance against harmful plant pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 100: 242–254
- GHAG SB. 2017b. Host induced silencing of fungal pathogen genes: an emerging strategy for disease control in crop plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1(6): 100–118
- GHAG SB, SHEKHAWAT UKS, GANAPATHI TR. 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
- GOVINDARAJULU M, EPSTEIN L, WROBLEWSKI T, MICHELMORE RW. 2015. Host-induced gene silencing inhibits the biotrophic pathogen causing downy mildew of lettuce. *Plant Biotechnology Journal*, 13(7): 875–883
- KETTING RF. 2011. The many faces of RNAi. *Developmental Cell*, 20(2): 148–161
- KOCH A, KOGEL KH. 2014. New wind in the sails: improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing. *Plant Biotechnology Journal*, 12: 821–831

- LEE HC, CHANG SS, CHOUDHARY S, AALTO AP, MAITI M, BAMFORD DH, LIU Y. 2009. qiRNA is a new type of small interfering RNA induced by DNA damage. *Nature*, 459(7244): 274–277
- LEE HC, LI LD, GU WF, XUE ZH, CROSTHWAITE SK, PERTSEM-LIDIS A, LEWIS ZA, FREITAG M, SELKER EU, MELLO CC, et al. 2010. Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi. *Molecular Cell*, 38(6): 803–814
- LIU G. 2016. Prevention and control of cotton *Verticillium* wilt by using HIGS technology of Microbiology Institute of Chinese Academy of Sciences. *Pesticide Market Information*, (8): 45 (in Chinese) [刘刚. 2016. 中科院微生物所运用 HIGS 技术实现对棉花黄萎病的防控. *农药市场信息*, (8): 45]
- LIU YM, XUE MF, SHI WQ, HUANG W, YUAN B. 2017. The application of host-induced gene silencing in improving the resistance of crop to disease and insect. *Hubei Agricultural Sciences*, 56(23): 4454–4456, 4460 (in Chinese) [刘友梅, 薛敏峰, 史文琦, 黄薇, 袁斌. 2017. 寄主诱导的基因沉默在改良作物抗病虫性方面的应用. *湖北农业科学*, 56(23): 4454–4456, 4460]
- MELNYK CW, MOLNAR A, BAULCOMBE DC. 2011. Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO Journal*, 30(17): 3553–3563
- MENG YJ, SHAO CG, WANG HZ, JIN YF. 2012. Target mimics: an embedded layer of microRNA-involved gene regulatory networks in plants. *BMC Genomics*, 13: 197
- NAKAYASHIKI H. 2005. RNA silencing in fungi: mechanisms and applications. *FEBS Letters*, 579(26): 5950–5957
- NAKAYASHIKI H, NGUYEN QB. 2008. RNA interference: roles in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*, 11(6): 494–502
- NICOLAS FE, MOXON S, DE HARO JP, CALO S, GRIGORIER IV, TORRES-MARTÍNEZ S, MOULTION V, RUIZ-VÁZQUEZ RM, 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
- NOWARA D, GAY A, LACOMME C, SHAW J, RIDOUT C, DOUCHKOV D, HENSEL G, KUMLEHN J, SCHWEIZER P. 2010. HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *Plant Cell*, 22(9): 3130–3141
- NUNUS CC, DEAN RA. 2012. Host-induced gene silencing: a tool for understanding fungal host interaction and for developing novel disease control strategies. *Molecular Plant Pathology*, 13(5): 519–529
- PANWAR V, MCCALLUM B, BAKKEREN G. 2013a. Endogenous silencing of *Puccinia triticina* pathogenicity genes through in planta-expressed sequences leads to suppression of rust diseases on wheat. *The Plant Journal*, 73(3): 521–532
- PANWAR V, MCCALLUM B, BAKKEREN G. 2013b. Host-induced gene silencing of wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* pathogenicity genes mediated by the *Barley stripe mosaic virus*. *Plant Molecular Biology*, 81(6): 595–608
- PLIEGO C, NOWARA D, BONCIANI G, GHEORGHE DM, XU R, SURANA P, WHIGHAM E, NETTLETON D, BOGDANOVA AJ, WISE RP, et al. 2013. Host-induced gene silencing in barley powdery mildew reveals a class of ribonuclease-like effectors. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 26(6): 633–642
- SHARP PA. 2001. RNA interference: 2001. *Genes & Development*, 15(5): 485–490
- STÄRKEL C. 2011. Host induced gene silencing-strategies for the improvement of resistance against *Cercospora beticola* in sugar beet (*B. vulgaris* L.) and against *Fusarium graminearum* in wheat (*T. aestivum* L.) and maize (*Z. mays* L.). Ph. D Thesis. Berlin, Germany : University of Hamburg
- TALBOT NJ. 2003. On the trail of a cereal killer: exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology*, 57: 177–202
- TAN CL, MA W, GUO J. 2017. Creation of *Brassica oleracea* L. resistance materials by HIGS.//Proceedings of the 2017 Annual Meeting of Chinese Society of Plant Pathology. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press (in Chinese) [谭成龙, 马微, 郭军. 2017. 利用 HIGS 技术创制短柄草抗赤霉病材料.//中国植物病理学会 2017 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社]
- TANG Z, ZHANG Q, XIANG P. 2018. Construction of HIGS expression vector of *RHO1* gene and disease resistance of transgenic rice. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 46(8): 45–52 (in Chinese) [唐喆, 张强, 项萍. 2018. *RHO1* 基因的 HIGS 表达载体构建及转基因水稻的抗病性分析. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 46(8): 45–52]
- TORRES-MARTÍNEZ S, RUIZ-VÁZQUEZ RM. 2016. RNAi pathways in *Mucor*: a tale of proteins, small RNAs and functional diversity. *Fungal Genetics and Biology*, 90: 44–52
- TUO Q, ZHU XG, TAN CL, LIU P, GUO J, KANG ZS, GUO J. 2018. Host-induced gene silencing of an important pathogenicity factor PsCPK1 in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* enhances resistance of wheat to stripe rust. *Plant Biotechnology Journal*, 16(3): 797–807
- WANG CH, ZHANG BS, MENG QK. 2009. Advances in research on the harm and biodegradation of common mycotoxins to human body. *Shaanxi Journal of Agricultural Sciences*, 55(4): 99–101, 107 (in Chinese) [王春红, 张宝善, 孟泉科. 2009. 常见真菌毒素对人体的危害及生物降解研究进展. *陕西农业科学*, 55(4): 99–101, 107]
- WANG M, WEIBERG A, LIN FM, THOMMA BP, HUANG HD, JIN H. 2016. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature Plants*, 2: 16151
- WANG MY, LIU J, QU SH, WANG XL, WANG GL. 2015. Construction and genetic transformation of HIGS expression vector

- against rice blast fungus. *Plant Protection*, 41(3): 73–78 (in Chinese) [王梦颖, 刘敬, 瞿绍洪, 王旭丽, 王国梁. 2015. 水稻抗稻瘟菌 HIGS 表达载体的构建及遗传转化. *植物保护*, 41(3): 73–78]
- WASSENEGGER M, KRCZAL G. 2006. Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends in Plant Science*, 11(3): 142–151
- WEIBERG A, WANG M, LIN FM, ZHAO H, ZHANG Z, KALOSHIAN I, HUANG HD, JIN H. 2013. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science*, 342(6154): 118–123
- YIN C, JURGENSON JE, HULBERT SH. 2011. Development of a host-induced RNAi system in the wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(5): 554–561
- ZHANG H, GUO J, VOEGELE RT, ZHANG J, DUAN Y, LUO H, KANG Z. 2012. Functional characterization of calcineurin homologs PsCNA1/PsCNB1 in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* using a host-induced RNAi system. *PLoS ONE*, 7(11): e49262
- ZHANG HS, HU YY, ZHANG N, WEI XJ, YANG WX, LIU DQ. 2013. Advances in host-induced gene silencing (HIGS) technology. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 21(5): 604–611 (in Chinese) [张河山, 胡亚亚, 张娜, 魏学军, 杨文香, 刘大群. 2013. 寄主诱导的基因沉默(HIGS)技术研究进展. *农业生物技术学报*, 21(5): 604–611]
- ZHANG MX, WANG QH, XU K, MENG YL, QUAN JL, SHAN WX. 2011. Production of dsRNA sequences in the host plant is not sufficient to initiate gene silencing in the colonizing oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. *PLoS ONE*, 6(11): e28114
- ZHANG T, JIN Y, ZHAO JH, GAO F, ZHOU BJ, FANG YY, GUO HS. 2016. Host-induced gene silencing of the target gene in fungal cells confers effective resistance to the cotton wilt disease pathogen *Verticillium dahliae*. *Molecular Plant*, 9(6): 939–942
- ZHAO M, ZHOU EX, SHU CW. 2017. Screening and expression analysis of interaction genes between *Rhizoctonia solani* and rice. // *Proceedings of 2017 Annual Meeting of Chinese Society of Plant Pathology*. Beijing: China Agricultural Science and Technology (in Chinese) [赵美, 周而勋, 舒灿伟. 2017. 水稻纹枯病菌与水稻互作基因的筛选和表达分析. //中国植物病理学会 2017 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社]
- ZHAO MF, HO HH, WU YX, HE YQ, LI ML. 2014. Western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*) transmits *Maize chlorotic mottle virus*. *Journal of Phytopathology*, 162: 534–536
- ZHU L, ZHU J, LIU Z, ZHOU C, WANG H. 2017. Host-induced gene silencing of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* pathogenicity genes mediated by the *Brome mosaic virus*. *Genes*, 8(10): E241
- ZHU Q, MAO Q, WANG Z, FU DH, SHI ZP. 2003. Prevention and detoxification of food mycotoxin contamination. *Food Science*, 24(8): 264–268 (in Chinese) [朱旗, 毛清黎, 王征, 傅冬和, 施兆鹏. 2003. 粮食真菌毒素污染的预防与脱毒. *食品科学*, 24(8): 264–268]

(责任编辑:张俊芳)