

# 喷施诱导的基因沉默(SIGS)技术控制植物病害研究进展

陈夕军\*, 石童, 陈宸, 唐滔

(扬州大学园艺与植物保护学院, 扬州 225009)

**摘要** 喷施诱导的基因沉默(spray-induced gene silencing, SIGS)技术是一种新型基因沉默技术,其以病原菌生长发育和致病相关基因为靶标,将体外合成的针对靶基因的 dsRNA 喷施于植物表面,抑制靶基因的表达。在病原菌侵染寄主的过程中,病原菌可直接从寄主植物表面摄取 dsRNA,也可由植物吸收 dsRNA 后,直接以 dsRNA 的形式或将 dsRNA 剪切成 sRNAs 转运至病原菌体内诱导病原菌相关基因沉默,从而抑制病菌的侵染和扩展。由于 SIGS 技术不需要转基因,再加上其具有高效性、特异性和环境友好性,故显示出巨大的应用潜力。本文综述了 SIGS 技术的最新研究进展,总结了影响 SIGS 控制植物病害的因素及未来的研究方向,展望了其应用前景。

**关键词** 喷施诱导的基因沉默; 双链 RNA; RNA 干扰; 真菌病害

**中图分类号:** S432.44 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2021477

## Advances in the control of plant diseases via spray-induced gene silencing

CHEN Xijun\*, SHI Tong, CHEN Chen, TANG Tao

(Horticulture and Plant Protection College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract** Spray-induced gene silencing (SIGS) is a novel RNAi method inducing gene silencing. It targets the genes related to the growth, development and pathogenicity of pathogens and sprays dsRNA synthesized *in vitro* against the target gene on the plant surface to inhibit the expression of the target gene. In the course of infection, pathogens can directly take up dsRNA molecules from the plant surface, and these dsRNA molecules can also be taken up by plants, even cleaved into sRNAs, and then transferred into pathogens to interfere the expression of the target genes and inhibit the infection and expansion of the pathogens. SIGS shows great application potential because of its high efficiency, specificity, environmental friendliness, without genetically modified products. In this review, recent advances in SIGS were summarized, and the factors influencing plant disease control, future research directions and application prospects of SIGS were also discussed.

**Key words** spray-induced gene silencing; dsRNA; RNA interference; fungal disease

在自然情况下,生态系统是一个动态、复杂的系统,其演替至顶级后能实现自我更新并能维持自身功能处于较高水平和较小波动的状态<sup>[1]</sup>。但当某些干扰超过其承受阈值时,生态系统的结构和功能就会发生变化<sup>[2]</sup>。农业生态系统是受到人类强烈干预的自然经济复合生态系统,不同于自然系统的是,农业生态系统是以农业产出的物质和服务为基础的<sup>[3-4]</sup>。片面地追求农产品的产量与品质,使得遗传背景相似的高产品种、高肥密植的栽培措施、防治对象广谱的化学药剂等被广泛应用。农作物病害的发

生、病原菌的抗药性、环境的污染等也越来越严重<sup>[5-10]</sup>。近年来,研究者们开始寻求一些绿色的农作物病害防控措施,如抗性品种、生物源诱抗物质、生防菌剂和转基因技术等的应用<sup>[11-14]</sup>。但由于传统的抗性育种花费时间长,获得的品种易因病菌变异失去抗性<sup>[15-16]</sup>;作物对某些病菌的抗性仅由数量性状基因控制,生产上无高抗或免疫的种质资源<sup>[17]</sup>;生物源诱抗物质虽可提高植物内禀抗性,但对病害防效较低<sup>[18-19]</sup>;生防菌剂的防效易受环境影响,持效期较短<sup>[20-22]</sup>;很多植物不能进行遗传转化,以及人们

收稿日期: 2021-08-31 修订日期: 2021-11-11

基金项目: 江苏省重点研发计划(现代农业)重点项目(BE2020319);江苏省现代农业产业发展项目(2020-SJ-003-YD07)

\* 通信作者 E-mail: xjchen@yzu.edu.cn

对转基因农产品的接受程度和伦理<sup>[23-24]</sup>等原因,这些措施的运用均受到一定程度的限制。因此,亟须发展高效、可持续、对环境友好的病害防治方法,以符合人们对高产优质农产品的需求。喷雾诱导的基因沉默技术因其专一性、高效性、不需要转基因和对环境友好等特性,展示出良好的应用前景。

## 1 SIGS 技术的由来

1998 年,Fire 等<sup>[25]</sup>首次发现外源双链 RNA (double-stranded, dsRNA) 可根据同源性促发对相关基因活性的抑制;且小 RNA (small RNAs, sRNAs) 作为一类新的调节分子可通过 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 来沉默相关基因,从而抑制该基因的功能<sup>[26-27]</sup>。这些外源 RNA 沉默分子均源自外源基因的转入、病毒、类病毒和转座子,并通过核酸酶和向导 RNA (guide RNA, gRNA) 的作用进行转录后修饰<sup>[28]</sup>。在此研究基础上,病毒诱导的基因沉默 (virus-induced gene silencing, VIGS)、寄主诱导的基因沉默 (host-induced gene silencing, HIGS) 和丝状生物诱导的基因沉默 (filamentous organism-induced gene silencing, FIGS) 等技术很快被建立,并用于植物病害的防控<sup>[28-31]</sup>。但这些技术均建立于基因工程基础之上,而许多植物或病原真菌很难被进行遗传操作,再加上许多国家对转基因产品的接受程度较低,这些转基因方法的广泛适用性一直备受质疑。因此,非转基因方法也一直是人们寻求的目标。

一直以来,人们普遍认为,由于病原真菌和寄主植物的基因组及 RNA 分别被两套质膜和细胞外基质分开,侵染植物的病原真菌不可能在与寄主的互动中发挥 RNA 沉默作用,反之植物体也不可能通过与病原菌互作而沉默其相关基因<sup>[28]</sup>。但越来越多的研究表明,寄主植物和病原真菌之间可以利用 RNA 沉默机制来相互影响,病毒、sRNAs 和 dsRNA 等均可在病原真菌与寄主之间进行跨界传播<sup>[32-34]</sup>,这种跨界传播的基因沉默信号使 RNAi 和 sRNAs 在寄主-病原真菌通信中发挥重要作用<sup>[35-36]</sup>。但这些也仅是在寄主与病原物互作过程中通过特殊途径进行 RNA 的转运。直到最近才有研究表明,真菌可以像线虫、昆虫一样从环境中吸收 dsRNA<sup>[37-39]</sup>。Koch 等<sup>[39]</sup>通过在大麦表面喷施靶向禾谷镰孢 *Fusarium graminearum* 细胞色素 P450 羊毛甾醇 C-14 $\alpha$ -甲基化酶的长链非编码 dsR-

NA (791 nt CYP3-dsRNA), 然后接种病原菌, 病菌中的 CYP51A、CYP51B 和 CYP51C 基因表达量明显下调, 病菌的生长显著受到抑制, 病害严重程度降低, 该技术被称为喷施诱导的基因沉默 (spray-induced gene silencing), 简称 SIGS。

## 2 SIGS 在植物病害防治中的应用

作为一种新型的植物病害防控技术, SIGS 已被用于多种植物病害的治理研究, 并展示出良好的应用前景 (表 1)。将根据灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 核酸内切酶基因 *Bc-DCL1* 和 *Bc-DCL2* 序列体外合成的 *Bc-DCL1/2*-sRNAs 和 *Bc-DCL1/2*-dsRNA 分别喷施于番茄、草莓、葡萄、莴苣、洋葱和玫瑰的果实、叶片或花的表面, 能减少寄主中病菌量的积累, 并减小病斑面积<sup>[23]</sup>。将灰葡萄孢 *BcCYP51*、*Bcchs1* 和 *BcFE2* 基因经重叠 PCR 产生的长链 dsRNA 喷施于葡萄叶片、果实或经叶柄吸收, 均能显著减轻病害的发生<sup>[40]</sup>。以靶向核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 中编码 tRNA 酰胺连接酶和硫氧还蛋白还原酶基因的 dsRNA 处理病菌, 48 h 后靶基因表达量下降 50% 左右; 油菜叶面喷施该 dsRNA 后接种病原菌, 病斑面积最多可减小 85%<sup>[41]</sup>。分别以致病疫霉 *Phytophthora infestans* 的鸟嘌呤核苷酸结合 G 蛋白  $\beta$ -亚基 *PiGpB1* 基因、吸器膜蛋白 *PiHmp1* 基因、角质酶 *PiCut3* 基因和内切 1, 3(4)- $\beta$ -葡聚糖酶 *PiEndo3* 基因为靶标, 将体外合成的 dsRNA 喷施于马铃薯叶片后, dsRNA<sup>*PiGpB1*</sup> 强烈抑制病菌孢子的形成; dsRNA<sup>*PiEndo3*</sup> 和 dsRNA<sup>*PiCut3*</sup> 虽不能完全抑制孢子的产生, 但处理叶片上的孢子量明显较低; 4 种 dsRNA 均能使致病疫霉在马铃薯叶片上导致的病斑面积变小<sup>[42]</sup>。以靶向大豆锈病病菌 *Phakopsora pachyrhizi* 乙酰辅酶 A 酰基转移酶基因 *ATC*、核糖体蛋白 S16 基因 *RP\_S16* 和甘氨酸裂解系统 H 蛋白基因 *GCS\_H* 的 dsRNA 喷施于离体大豆叶片表面, 可使叶面孢子堆数减少 73%, 叶片中菌量减少 75%, 有效控制了大豆锈病的发生<sup>[43]</sup>。

除被用于丝状生物引起的植物病害的防控, dsRNA 还被应用于防治病毒病。将靶向烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus, TMV) *p126* 和 *CP* 基因的 dsRNA 外源喷施于烟草叶片表面, 3 d 后, 只接种 TMV 的植株中 80% 以上的植株出现脉明和褪绿斑, 而 TMV/dsRNA<sub>p126</sub> 和 TMV/dsRNA<sub>CP</sub> 处

理株则无症状;10 d 后,所有只接种 TMV 的植株均表现严重花叶症状,而 TMV/dsRNA\_p126 和 TMV/dsRNA\_CP 处理株的病株率仅为 35% 和 50%,且这种效果可持续 20 d 以上<sup>[57]</sup>。

表 1 SIGS 在植物病害控制领域的研究进展

| Table 1 Recent advance in spray-induced gene silencing (SIGS) for controlling diseases |                                       |                       |                                                                                    |                   |
|----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 病原菌<br>Pathogen                                                                        |                                       | 寄主植物<br>Host plant    | 靶标基因<br>Target gene                                                                | 参考文献<br>Reference |
| 灰葡萄孢                                                                                   | <i>Botrytis cinerea</i>               | 番茄,莴苣,玫瑰,葡萄           | VPS51, SAC1, DCTN1, DCL1/DCL2                                                      | [44]              |
|                                                                                        |                                       | 油菜                    | BC1G_04775, BC1G_01592, BC1G_04995, BC1G_04775, BC1G_01592, BC1G_07805, BC1G_10306 | [41]              |
|                                                                                        |                                       | 番茄,草莓,葡萄,莴苣,洋葱,玫瑰,拟南芥 | DCL1/DCL2                                                                          | [23]              |
|                                                                                        |                                       | 葡萄                    | CYP51, chs1, EF2                                                                   | [40]              |
| 核盘菌                                                                                    | <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>       | 莴苣,羽衣甘蓝               | VPS51, SAC1, DCTN1, DCL1/DCL2                                                      | [44]              |
|                                                                                        |                                       | 油菜                    | SS1G_01703, SS1G_02495, SS1G09897, SS1G_07873, 06487                               | [41]              |
|                                                                                        |                                       | 拟南芥                   | SS1G_03208, SS1G_09680, SS1G_12640, SS1G_13746, SS1G_11912, SS1G02495, SS1G_07873  | [41]              |
| 立枯丝核菌                                                                                  | <i>Rhizoctonia solani</i>             | 水稻                    | SAC1, DCTN1, PG                                                                    | [44]              |
| 黑曲霉                                                                                    | <i>Aspergillus niger</i>              | 番茄,苹果,葡萄              | VPS51, SAC1, DCTN1, pgxB                                                           | [44]              |
| 大丽轮枝菌                                                                                  | <i>Verticillium dahliae</i>           | 拟南芥                   | SAC1, DCTN1, DCL1, DCL2                                                            | [44]              |
| 胶孢炭疽菌                                                                                  | <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | 樱桃,苹果,番茄              | VPS51, SAC1, DCTN1, DCL1/DCL2                                                      | [44]              |
| 禾谷镰孢                                                                                   | <i>Fusarium graminearum</i>           | 拟南芥                   | CYP51A, CYP51B, CYP51C                                                             | [50]              |
|                                                                                        |                                       | 大麦                    | CYP51A, CYP51B, CYP51C, (DCL-1)                                                    | [39,49]           |
| 亚洲镰孢                                                                                   | <i>Fusarium asiaticum</i>             | 小麦                    | Myo5                                                                               | [48]              |
| 豆薯层锈菌                                                                                  | <i>Phakopsora pachyrhizi</i>          | 大豆                    | ATC, GCS_H, RP_S16                                                                 | [43]              |
| 致病疫霉                                                                                   | <i>Phytophthora infestans</i>         | 马铃薯                   | HMP1, PGB1, DCTN1, SAC1, DCL1                                                      | [44]              |
|                                                                                        |                                       |                       | GPB1, OSBP, Hmp1, Cut3, Endo3                                                      | [42]              |
| 黄瓜花叶病毒                                                                                 | cucumber mosaic virus                 | 豌豆,烟草                 | CMV2b                                                                              | [24]              |
| 辣椒轻斑驳病毒                                                                                | pepper mild mottle virus              | 烟草                    | PMMoVIR54                                                                          | [24]              |

### 3 影响 SIGS 对病害防控效果的因素

#### 3.1 病原菌摄取环境 dsRNA 的能力

病原菌可以摄取环境中的 dsRNA 是利用 SIGS 进行病害控制的基础,但不同病原菌从环境中摄取 dsRNA 的能力是不同的。Qiao 等<sup>[44]</sup>以荧光素标记的 YFP-dsRNA 分别处理常见病原真菌灰葡萄孢、核盘菌、黑曲霉 *Aspergillus niger*、立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani*、大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae*、胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 和病原卵菌致病疫霉,以及非致病真菌绿色木霉 *Trichoderma virens*,结果发现虽然灰葡萄孢、核盘菌、黑曲霉、立枯丝核菌等均能很好地从环境中摄入 dsRNA,但绿色木霉摄入 dsRNA 的量很少,而胶孢炭疽菌中根本检测不到。进一步研究发现,可以摄入外源 dsRNA 的病菌,在使用靶向致病基因的 dsRNA 处理后,其致病性均明显减轻<sup>[39-41, 44]</sup>。致病疫霉从外源环境中摄入 dsRNA 的效率比较低,因

此外源喷施不同致病基因的 dsRNA 对致病疫霉在马铃薯叶片上的生长发育和病斑的扩展均无抑制作用<sup>[44]</sup>。

有趣的是,关于致病疫霉从环境中摄取 dsRNA, Kalyandurg 等<sup>[42]</sup>的研究结果与 Qiao 等<sup>[44]</sup>的结论完全相反。Kalyandurg 等<sup>[42]</sup>首先将 GFP 基因转入致病疫霉,然后用以青色素 3-UTP 标记的 dsRNA<sup>GFP</sup> (Cy3-dsRNA<sup>GFP</sup>) 和根据 MEGAscript 试剂盒中对照模板合成的 dsRNA (Cy3-dsRNA<sup>Ct</sup>) 处理转化的菌株孢子囊,24 h 后 Cy3-dsRNA<sup>GFP</sup> 处理的致病疫霉孢子囊中 GFP 荧光减弱,而对照组无变化;将 20 ng/ $\mu$ L 的 Cy3-dsRNA<sup>Ct</sup> 喷施在马铃薯离体叶片表面,24 h 后接种转化 GFP 标记的致病疫霉孢子悬浮液,5 d 后病部致病疫霉的菌丝和孢子囊中 GFP 和 Cy3-dsRNA<sup>Ct</sup> 呈共定位,说明外源的 Cy3-dsRNA<sup>Ct</sup> 可以通过喷施在马铃薯叶片表面而被致病疫霉吸收。两者研究结果的不同是因为选用了不同的菌株,还是由于其他原因,还有待进一步研究。

### 3.2 不同 dsRNA 片段的沉默效应

SIGS 防控植物病害的基本原理是通过吸收环境中的 dsRNA 或 sRNAs, 沉默病菌生长发育或致病相关基因, 从而减轻病害的发生。dsRNA 可通过 2 种途径进入病菌体内: 一是外源 dsRNA 先进入植物细胞, 然后由植物细胞转运至病菌体内, 并被植物或病菌体内的 DCL(dicer-like) 蛋白剪切成 sRNAs; 另一种是 dsRNA 直接进入病菌体内, 并由病菌 DCL 蛋白切割, 形成 sRNAs<sup>[23,39,44]</sup>。无论哪种途径, 最终起作用的均为 sRNAs, 而 sRNAs 对 mRNA 的结合部位碱基有偏好性, GC 含量较低的 mRNA 被沉默效果较好, 而且靶 RNA 的剪切位点主要是由 gRNA 的 5' 端序列决定的, 因此源自不同 dsRNA 片段的 sRNAs 引起的沉默效应是不同的<sup>[45-47]</sup>。将亚洲镰孢 *F. asiaticum* 肌球蛋白 5 基因 *Myo5* 不同区段的 cDNA 序列构建至干扰载体, 虽然多数阳性转化子呈现生长速率变慢、对渗透压更敏感、分生孢子分隔变少、液泡数量增加、细胞壁几丁质含量降低、无性和有性繁殖体数量变少、致病能力变弱等变化, 但部分转化子的所有性状与野生型菌株相比并无显著差异<sup>[48]</sup>。

禾谷镰孢 *CYP51* 基因簇包含 3 个基因, 分别为 *FgCYP51A*、*FgCYP51B* 和 *FgCYP51C*, 将分别靶向单基因、双基因和三基因的 dsRNA CYP-A、CYP-B、CYP-C、CYP-AB、CYP-AC、CYP-BC 和 CYP3RNA 喷施于大麦叶片表面, 发现靶向 3 个基因的 CYP3RNA 可减少病部面积达 93%, 效果远好于靶向单个和 2 个基因的 dsRNA<sup>[49]</sup>。即使靶向单个基因, 250 bp 的 dsRNA 的沉默效果均在 60% 以下, 而 800 bp 的 dsRNA 沉默效果在 80% 以上<sup>[50]</sup>。而一般认为, RNAi 片段的长度在 98~853 bp 之间都是可行的, 不会对沉默效率产生影响<sup>[51]</sup>。因此, 在进行 SIGS 防治植物病害过程中, 可以在允许范围内, 以多个致病相关基因为靶标, 合成靶向多个基因的 dsRNA, 以取得更好的防病效果。Qiao 等<sup>[44]</sup> 分别以多种真菌的液泡分拣蛋白 51 基因 *VPS51*、动力蛋白激活蛋白基因 *DCTN1* 和肌动蛋白抑制子基因 *SAC1* 为靶标, 经重叠 PCR 并构建至 T7 启动子进行体外转录得到靶向多基因的 dsRNA, 喷施到植物叶片表面或进行蘸根处理, 除不能摄取环境中 dsRNA 的胶孢炭疽菌与致病疫霉外, 其他几种病菌的致病性均受到显著抑制。

### 3.3 dsRNA 的稳定性及对病害控制的持效性

SIGS 是通过外源喷施 dsRNA 诱导与病菌生长发育和致病相关的基因沉默, 从而降低病菌致病性。dsRNA 虽不像单链 RNA(single-stranded, ssRNA) 那样极易被降解, 但由于病原菌体内环境中存在大量 RNA 酶, 可能使 dsRNA 失去活性。特别是在田间条件下, 紫外线照射、雨水冲刷和微生物降解等, 更是其降解和失活的主要原因<sup>[58-59]</sup>。有研究表明, 具有杀虫活性的 *DvSnf7* dsRNA 在土壤中被降解 50% 的时间小于 30 h, 被降解 95% 的时间小于 35 h, 而且其降解动力学不受初始施用浓度的影响<sup>[60]</sup>。尽管在无菌水中 dsRNA 相对稳定, 但在自然水系中, dsRNA 极不稳定, 水系中有或无沉淀物其被降解 50% 的时间均小于 6 d<sup>[61]</sup>。关于 dsRNA 施用于植物表面防控植物病害, 目前的报道表明, 在 dsRNA 处理后的几个小时内接种相应的病原菌, 可明显减轻病害严重度, 若 dsRNA 处理与接种病菌的间隔时间延长, 则病害防控效率降低<sup>[39-44]</sup>。Mitter 等<sup>[24]</sup> 研究发现, 利用裸露的 CMV2b-dsRNA 处理豇豆和烟草叶片, 5 d 后接种 CMV, 其对病害防效显著, 若 20 d 后接种, 则完全失去作用; 但用纳米黏土片作载体, 因纳米黏土片可很好地保护 dsRNA 不被降解, 20 d 后接种, 其防病效果依然可达 68%。Song 等<sup>[48]</sup> 也发现, 如果不能持续的供应 dsRNA, 沉默效应仅仅只能持续 9 h; 但若喷施于植物表面的 dsRNA 被植物细胞吸收, 则其持续效应较长。

至于为何 dsRNA 处理叶片要比直接处理病菌沉默效果持续时间更长, Song 等<sup>[48]</sup> 进一步研究发现, 靶向真菌致病基因的 dsRNA 被植物细胞吸收后, 可以在植物体内被转运, 并在植物体内被切割成 18~27 bp 的 sRNAs, 转移进病菌细胞; 同时植物还可利用自身的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRP)以 dsRNA 核酸链为模板进行扩增, 产生大量二次扩增的 dsRNA 产物, 并转移至病菌细胞内, 从而维持较长时间的基因沉默效应。

除上述因素外, 由于不同基因对病菌致病力影响不同, 因此针对不同靶基因设计的 dsRNA 喷施后对病害的防控效果亦会有显著差异。而对病菌如何摄取外源 dsRNA 和 dsRNA 在寄主-病原菌间如何相互转运并产生作用的分子机制不明, 成熟地应用外源 dsRNA 防控植物病害的技术还未研发, 这些均

影响到 SIGS 在田间的应用及其防效。

## 4 有关 SIGS 应用的未来研究方向

如前所述,不同病原菌对外源 dsRNA 的摄取能力是不同的,但至目前为止,有关病原真菌如何摄取外源 dsRNA 还未有报道。Koch 等<sup>[52]</sup>研究发现,在 HIGS 过程中植物细胞的囊泡系统起到关键作用,在植物的胞外囊泡和非原质体液中均能检测到靶基因 dsRNA 源的小分子干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA); 转化所需的核内体分选复合物 III (endosomal sorting complex required for transport III, ESCRT-III) 突变后 HIGS 效应受损,进一步说明了内源囊泡运输支持转基因来源的 siRNA 在植物细胞和病原真菌细胞间的转移。但植物体外囊泡和非原质体液中的 dsRNA,以及直接用 dsRNA 处理真菌菌丝、孢子时,dsRNA 是如何进入真菌细胞的还完全未知,明确真菌摄入 dsRNA 机制及真菌摄取 dsRNA 能力差异的原因,是未来研究的方向之一。

由于存在紫外线、化学物质和 RNA 酶等,裸露的 dsRNA 在自然环境中并不稳定,为了提高 SIGS 的应用效果,必须延缓用于 SIGS 的 dsRNA 在自然界中的降解速度。对于化学农药来说,一些表面活性剂、助剂、无机盐和长效缓释添加剂等均有增加农药在植物表面的滞留量、延长滞留时间和提高对作物表面穿透的能力。而对于 dsRNA,已有研究表明,选用纳米黏土片层作为载体可以有效延长 dsRNA 的 SIGS 效应<sup>[24]</sup>。但是否有其他方法或加入某些助剂可有效保护 dsRNA 的稳定性、延长 SIGS 的效应,还未见报道。

RNAi 的沉默效应与起始 dsRNA 的浓度有关,虽然起始 dsRNA 的浓度在 1.5~100 nmol/L 间产生的沉默效果相似,但当起始 dsRNA 浓度低至 0.05 nmol/L 时,沉默效应完全消失<sup>[53]</sup>。在进行 SIGS 技术应用时,真菌摄取 dsRNA 的能力、植物中 dsRNA 向真菌中转移的能力、初始 dsRNA 的施用浓度,均会影响基因沉默效应,也终将影响 SIGS 技术对病害的控制效果。Qiao 等<sup>[44]</sup>在研究 SIGS 控制植物病害时,分别使用 20、40 ng/ $\mu$ L 和 100 ng/ $\mu$ L dsRNA 处理果实与花瓣、马铃薯叶片和番茄叶片以达到较好的防病效果。此外,由于病菌对化学农药的抗药性越来越严重,导致许多花费了巨大人力、物

力、财力研发的药剂已失去或即将失去应用效果,是否可以将这些药剂与 dsRNA 进行复配从而提高病害的防控效果,延缓病菌抗药性的产生? 甚至靶向病原菌的抗药性基因,使抗药菌株失去抗药性,从而使失去病害防控效果的旧的药剂能重新在田间加以应用。

寻找广谱性化学农药和对病原菌高效、特异的控制靶点一直是人们追求的目标,人们希望使用一种农药就可以防治多种有害生物。但大量广谱性化学农药的使用,造成了严重的生态灾难,如有益微生物、天敌的无差别杀灭,生态环境中非靶标生物的种群数量的改变和多次使用单一药剂导致的靶标对象的高抗药性等。因此,应用 SIGS 技术控制植物病害时,同样要考虑 dsRNA 的广谱性和脱靶效应。如靶向 *FgCYP51B* 基因的 dsRNA CYP-B 喷施于大麦叶片表面,同样可以沉默非靶标的 *FgCYP51A* 和 *FgCYP51C* 基因,而 CYP-AC、CYP-AB 和 CYPBC 同样可以靶向非靶标基因 *FgCYP51B*、*FgCYP51C* 和 *FgCYP51A*<sup>[49]</sup>。这样的脱靶效应如果对其他生物起作用,则会出现与化学农药同样的环境破坏效果。而且,由于外源 dsRNA 在植物体内可以进行二次扩增,即使喷施的 dsRNA 并未与非靶标生物直接接触,也会因为后期非靶标生物与寄主植物的接触而引起脱靶效应。因此,借助生物信息学工具,精心设计和精准预测需要合成与使用的 dsRNA 是非常必要的,以免对相关或非相关生物产生非靶标效应<sup>[54]</sup>。

尽管施用外源 dsRNA 不是直接对生物体遗传物质进行修饰,但仍可能存在一定风险。如 Heine-mann<sup>[56]</sup>所述:1)dsRNA 并非如人们想象的那样,只在细胞质中起作用,它可以与一些蛋白(如 Dicer 和 NRDE-3)协同一起进入细胞核,从而对 DNA 和组织蛋白进行修饰;2)生物体的基因并不全部存在于细胞核中,如线粒体、叶绿体也都有自己的基因组,外源 dsRNA 有可能会对这些基因进行修饰;3)外源施用的 dsRNA 有可能会被逆转录,形成的 DNA 则可能会被整合到宿主基因组中,从而改变宿主的遗传信息;4)dsRNA 可以通过对基因进行敲除、改变拷贝数、影响染色质压实程度及调控序列对转录因子的接受程度等,影响宿主遗传物质组成及其表达;5)外源 dsRNA 可以在宿主细胞中遗传,从而改变了生物体的遗传信息等。当然,这些报道均基于通过

转基因手段获得的外源 dsRNA, 直接外源喷施影响施用植物安全或食品安全的例子还未有报道。但 Song 等<sup>[48]</sup>发现, 外源施用的 dsRNA 进入植物体内, 植物可以利用自身的 RdRP 以 dsRNA 核酸链为模板进行扩增, 产生大量二次扩增的 dsRNA 产物。至于这些二次扩增的产物是否在植物体内有其他效应, 或者能否对植物体遗传物质进行修饰, 甚至直接遗传给后代, 均还有待于进一步研究。

## 5 展望

随着现代生物技术的发展及寄主-病原物互作分子机制研究的深入, 基于遗传物质的病害防控技术因其专一性、高效性和环境友好性而广受青睐。但在多数国家对转基因农产品接受程度普遍较低的情况下, 多种通过转基因控制病害的技术措施在大多数作物上被限制应用。SIGS 因为不需要转基因, 解决了许多植物不能进行遗传操作的难题, 而且 dsRNA 来源于病原菌本身, 不会在土壤和环境中留下有毒残留物而对环境造成污染, 从而具有更广阔的应用前景。虽然目前世界各国对 dsRNA 产品的应用与管理还未有共识, 但包括欧洲科学界在内的各国科学家和相关组织已经开始评估此类产品的监管框架<sup>[55-56]</sup>。西方国家中, 美国暂未有相关要求, 但欧盟对喷施或外源施用的 dsRNA 农药管理则参照生物化学农药执行, 其技术级材料 and 产品均需进行哺乳动物或非靶标生物毒性测定; 如特定的产品配方阻碍或促进了 dsRNA 的吸收, 还必须提供这些特定配方的非靶标生物毒理学数据, 以更好的确认其潜在危害<sup>[62]</sup>。此外, 如利用工程菌株生产 dsRNA, 工程菌作为中间体必须受有毒物质控制法案监管, 在生产前提交微生物商业活动通知函<sup>[62-63]</sup>。在我国, 目前还未有 dsRNA 农药相关登记管理规定。但作为新兴的植物病害防控措施, 基于 dsRNA 的农药在不久的将来肯定会在生产上广泛应用, 这也要求监管部门要立即对这一类农药进行风险评估, 以满足生产与社会需求。

## 参考文献

- [1] HAUTIER Y, TILMAN D, ISBELL F, et al. Anthropogenic environmental changes affect ecosystem stability via biodiversity [J]. *Science*, 2015, 348(6232): 336 - 340.
- [2] GUTZEROVÁ N, HERBEN T. Patch dynamics and local succession in a sandstone area with frequent disturbance [J]. *Journal of Vegetation Science*, 2001, 12(4): 533 - 544.
- [3] MATSON P A, PARTON W J, POWER A G, et al. Agricultural intensification and ecosystem properties [J]. *Science*, 1997, 277(5325): 504 - 509.
- [4] LENSSEN A W, SAINJU U M, ALLEN B L, et al. Diversified crop rotation and management system influence durum yield and quality [J]. *Agronomy Journal*, 2020, 112(5): 4407 - 4419.
- [5] DEAN R, VAN KAN J A L, PRETORIUS Z A, et al. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(4): 414 - 430.
- [6] MA Zhonghua, MICHAILIDES T J. Advance in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi [J]. *Crop Protection*, 2005, 24(10): 853 - 863.
- [7] BRENT K J, HOLLIMON D W. Fungicide resistance: The assessment of risk [M]. 2nd revised edition. United Kingdom: The fungicide resistance action committee, 2007.
- [8] GOULD F, BROWN Z S, KUZMA J. Wicked evolution: Can we address the sociobiological dilemma of pesticide resistance? [J]. *Science*, 2018, 360(6390): 728 - 732.
- [9] NACHIMUTHU V V, MUTHURAJAN R, DURAIALAGU-RAJA S, et al. Analysis of population structure and genetic diversity in rice germplasm using SSR markers: An initiative towards association mapping of agronomic traits in *Oryza sativa* [J/OL]. *Rice*, 2015, 8(1): 30. DOI: 10.1186/s12284-015-0062-5.
- [10] CALONNEC A, BRUIE J B, LANGLAIS M, et al. Impact of plant growth and architecture on pathogen processes and consequences for the epidemic behavior [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2013, 135(3): 479 - 497.
- [11] SHAHID I, HAN Jun, HANOOQ S, et al. Profiling of metabolites of *Bacillus* spp. and their application in sustainable plant growth promotion and biocontrol [J/OL]. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2021, 5: 605195. DOI: 10.3389/fsufs.2021.605195.
- [12] DY R L, RIGANO L A, FINERAN P C. Phage-based biocontrol strategies and their application in agriculture and aquaculture [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2018, 46(6): 1605 - 1613.
- [13] FAN Zhaoqian, QIN Yukun, LIU Song, et al. Chitosan oligosaccharide fluorinated derivative control root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) disease based on the multi-efficacy strategy [J/OL]. *Marine Drugs*, 2020, 18(5): 273. DOI: 10.3390/md18050273.
- [14] BROGUE K, CHET I, HOLLIDAY M, et al. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* [J]. *Science*, 1991, 254(5035): 1194 - 1197.
- [15] YIN Junjie, ZOU Lijun, ZHU Xiaobo, et al. Fighting the enemy: How rice survives the blast pathogen's attack [J]. *The*

- Crop Journal, 2021, 9(3): 543–552.
- [16] WILSON R A. *Magnaporthe oryzae* [J]. Trends in Microbiology, 2021, 29(7): 663–664.
  - [17] MOLLA K A, KARMAKAR S, MOLLA J, et al. Understanding sheath blight resistance in rice: the road behind and the road ahead [J]. Plant Biotechnology Journal, 2020, 18(4): 895–915.
  - [18] SAJJAN S, JAMADAR M M. *In vitro* evaluation of fungicides, biocontrol agents and botanicals for their bioefficacy against rot of acid lime (*Citrus aurantiifolia* Swingle) in northern Karnataka [J]. Karnataka Journal of Agricultural Sciences, 2015, 28(4): 628–630.
  - [19] MOLLOY C, CHEAH L H, KOOLAARD J P. Induced resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in carrots treated with enzymatically hydrolysed chitosan [J]. Postharvest Biology and Technology, 2004, 33(1): 61–65.
  - [20] MARIN V R, FERRAREZI J H, VIEIRA G, et al. Recent advances in the biocontrol of *Xanthomonas* spp. [J/OL]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019, 35(5): 72. DOI: 10.1007/s11274-019-2646-5.
  - [21] MCEVOY P B. Theoretical contributions to biological control success [J]. BioControl, 2018, 63: 87–103.
  - [22] WONG C K F, SAIDI N B, VADAMALAI G, et al. Effect of bioformulations on the biocontrol efficacy, microbial viability and storage stability of a consortium of biocontrol agents against Fusarium wilt of banana [J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 127(2): 544–555.
  - [23] WANG Ming, WEIBERG A, LIN Fengmao, et al. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection [J/OL]. Nature Plant, 2016, 2: 16151. DOI: 10.1038/nplants.2016.151.
  - [24] MITTER N, WORRALL E A, ROBINSON K E, et al. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses [J/OL]. Nature Plant, 2017, 3: 16207. DOI: 10.1038/nplants.2016.207.
  - [25] FIRE A, XU Siqun, MONTGOMERY M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391(6669): 806–811.
  - [26] HAMILTON A J, BAULCOMBE D C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants [J]. Science, 1999, 286(5441): 950–952.
  - [27] VAUCHERET H, FAGARD M. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators [J]. Trends in Genetics, 2001, 17(1): 29–35.
  - [28] BAULCOMBE D C. VIGS, HIGS and FIGS: small RNA silencing in the interactions of viruses or filamentous organisms with their plant hosts [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2015, 26(4): 141–146.
  - [29] THAKARE D, ZHANG Jianwei, WING R A, et al. Aflatoxin-free transgenic maize using host-induced gene silencing [J/OL]. Science Advances, 2017, 3(3): e1602382. DOI: 10.1126/sciadv.1602382.
  - [30] MUTHAPPA S K, MYSORE K S. New dimensions for VIGS in plant functional genomics [J]. Trends in Plant Science, 2011, 16(12): 656–665.
  - [31] RICCI A, SABBADINI S, MIOZZI L, et al. Host induced gene silencing and spray-induced gene silencing for crop protection against viruses [M]// MEZZETTI B, SWEET J, BRUGOS L. RNAi for plant improvement and protection. Chennai India: Exeter Premedia Service Pvt Ltd, 2021: 72–85.
  - [32] ANDIKA I B, WEI Shuang, CAO Chunmei, et al. Phytopathogenic fungus hosts a plant virus: A naturally occurring cross-kingdom viral infection [J]. Proceedings of the National Academy of the Science of the United States of America, 2017, 114(46): 12267–12272.
  - [33] KNIP M, CONSTANTIN M E, THORDAL-CHRISTENSEN H. Trans-kingdom cross-talk: Small RNAs on the move [J/OL]. PLoS Genetics, 2014; 10(9): e1004602. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004602.
  - [34] 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.
  - [35] TOMILOV A A, TOMILOVA N B, WROBLEWSKI T, et al. Trans-specific gene silencing between host and parasitic plants [J]. The Plant Journal, 2008, 56(3): 389–397.
  - [36] WEIBERG A, WANG Ming, LIN Fengmao, et al. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways [J]. Science, 2013, 342(6154): 118–123.
  - [37] KAMATH R S, MARTINEZ-CAMPOS M, ZIPPERLEN P, et al. Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J/OL]. Genome Biology, 2000, 2(1): research0002.1. DOI: 10.1186/gb-2000-2-1-research0002.
  - [38] MULOT M, BOISSINOT S, MONSION B, et al. Comparative analysis of RNAi-based methods to down-regulate expression of two genes expressed at different levels in *Myzus persicae* [J/OL]. Viruses, 2016, 8(11): 316. DOI: 10.3390/v8110316.
  - [39] KOCH A, BIEDENKOPF D, FURCH A, et al. An RNAi-based control of *Fusarium graminearum* infections through spraying of long dsRNA involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery [J/OL]. PLoS Pathogens, 2016, 12(10): e1005901. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005901.
  - [40] NERVA L, SANDRINI M, GAMBINO G, et al. Double-stranded RNAs (dsRNAs) as a sustainable tool against gray mold (*Botrytis cinerea*) in grapevine: effectiveness of different application methods in an open-air environment [J/OL]. Biomolecules, 2020, 10(2): 200. DOI: 10.3390/biom10020200.

- [41] MCLOUGHLIN A G, WYTINCK N, WALKER P L, et al. Identification and application of exogenous dsRNA confers plant protection against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea* [J/OL]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 7320. DOI: 10.1038/s41598-018-25434-4.
- [42] KALYANDURG P B, SUNDARARAJAN P, DUBEY M, et al. Spray-induced gene silencing as a potential tool to control potato late blight disease [J]. bioRxiv, 2021, 111(12): 2168–2175.
- [43] HU Dongfang, CHEN Zhiyuan, ZHANG Chunquan, et al. Reduction of *Phakopsora pachyrhizi* infection on soybean through host- and spray-induced gene silencing [J]. Molecular Plant Pathology, 2020, 21(6): 794–807.
- [44] QIAO Lulu, LAN Chi, CAPIRIOTTI L, et al. Spray-induced gene silencing for disease control is dependent on the efficiency of pathogen RNA take [J]. Plant Biotechnology Journal, 2021, 19(9): 1756–1768.
- [45] YOSHINARI K, MIYAGISHI M, TAIRA K. Effects on RNAi of the tight structure, sequence and position of the targeted region [J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(2): 691–699.
- [46] HOLEN T, AMARZGUIOUI M, WIIGER M T, et al. Positional effectors of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger tissue factor [J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(8): 1757–1766.
- [47] ELBASHIR S M, MARTINEZ A P, LENDECKEL W, et al. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate [J]. The EMBO Journal, 2001, 20(23): 6877–6888.
- [48] SONG Xiushi, GU Kaixin, DUAN Xiaoxin, et al. Secondary amplification of siRNA machinery limits the application of spray-induced gene silence [J]. Molecular Plant Pathology, 2018, 19(12): 2543–2560.
- [49] KOCH A, HÖFLE L, WERNER B T, et al. SIGS vs HIGS: a study on the efficacy of two dsRNA delivery strategies to silence *Fusarium FgCYP51* genes in infected host and non-host plant [J]. Molecular Plant Pathology, 2019, 20(12): 1636–1644.
- [50] HÖFLE L. Investigations on the mechanism of host-induced gene silencing of the fungal CYP51 genes in the *Fusarium-Arabidopsis* pathosystem [D]. Hessen Germany: Justus-Liebig-Universität Gießen, 2018.
- [51] WESLEY S V, HELLIVELL C A, SMITH N A, et al. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants [J]. The Plant Journal, 2001, 27(6): 581–590.
- [52] KOCH A, SCHLEMMER T, HOEFLE L, et al. Host-induced gene silencing involves transfer of dsRNA-derived siRNA via extracellular vesicles [J/OL]. bioRxiv, 2020, DOI: 10.1101/2020.02.12.945154.
- [53] ELBASHIR S M, HARBORTH J, YALCIN A, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. Nature, 2001, 411(6836): 494–498.
- [54] ZOTTI M, DOS SANTOS E A, CAGLIARI D, et al. RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes [J]. Pest Management Science, 2018, 74(6): 1239–1250.
- [55] GATHMANN A. The European perspective on regulatory aspects and experiences with dsRNA-based products [C]//Presentation at OECD conference on RNAi based pesticides. Paris, France, 2019.
- [56] HEINEMANN J A. Should dsRNA treatments applied in outdoor environments be regulated? [J/OL]. Environment International, 2019, 132: 104856. DOI: 10.1016/j.envint.2019.05.050.
- [57] KONAKALLA N C, KALDIS A, BERBATI M, et al. Exogenous application of double-stranded RNA molecules from TMV *p126* and *CP* genes confers resistance against TMV in tobacco [J]. Planta, 2016, 244(4): 961–969.
- [58] BACHMAN P, FISCHER J, SONG Zihong, et al. Environment fate and dissipation of applied dsRNA in soil, aquatic systems and plants [J/OL]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 21. DOI: 10.3389/fpls.2020.00021.
- [59] PARKER K M, BARRAGÁN B V, VAN LEEUWEN D M, et al. Environmental fate of RNA interference pesticides: adsorption and degradation of double-stranded RNA molecules in agricultural soil [J]. Environmental Science and Technology, 2019, 53(6): 3027–3036.
- [60] DUBELMAN S, FISCHER J, ZAPATA F, et al. Environmental fate of double-strand RNA in agricultural soils [J/OL]. PLoS ONE, 2014, 9: e93155. DOI: 10.1371/journal.pone.0093155.
- [61] FISCHER J R, ZAPATA F, DUBELMAN S, et al. Aquatic fate of a double-stranded RNA in sediment-water system following an over-water application [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2017, 36(3): 727–734.
- [62] DIETZ-PFEILSTETTER A, MENDELSON M, GATHMANN A, et al. Considerations and regulatory approaches in the USA and in the EU for dsRNA-based externally applied pesticides for plant protection [J/OL]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 682387. DOI: 10.3389/fpls.2021.682387.
- [63] WOZNIAC C, MCCLUNG G, GAGLIARDI J, et al. Regulation of genetically engineered microorganisms under FIFRA, FFDCA and TSCE [C]//WOZNIAC C A, MCHUGHEN A. Regulation of agricultural biotechnology: the United States and Canada. Dordrecht: Springer, 2013: 57–94.

(责任编辑: 杨明丽)