

August 2017

## Development of Gene Silencing Technique for Crop Protection Against Soil-borne Fungal Disease

Guo Huishan

*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*

*See next page for additional authors*

### Recommended Citation

Huishan, Guo; Feng, Gao; Jianhua, Zhao; and Bosen, Zhang (2017) "Development of Gene Silencing Technique for Crop Protection Against Soil-borne Fungal Disease," *Bulletin of Chinese Academy of Sciences (Chinese Version)*: Vol. 32 : Iss. 8 , Article 3.

DOI: <https://doi.org/10.16418/j.issn.1000-3045.2017.08.003>

Available at: <https://bulletinofcas.researchcommons.org/journal/vol32/iss8/3>

This Article is brought to you for free and open access by Bulletin of Chinese Academy of Sciences (Chinese Version). It has been accepted for inclusion in Bulletin of Chinese Academy of Sciences (Chinese Version) by an authorized editor of Bulletin of Chinese Academy of Sciences (Chinese Version). For more information, please contact [lcyang@cashq.ac.cn](mailto:lcyang@cashq.ac.cn), [yjwen@cashq.ac.cn](mailto:yjwen@cashq.ac.cn).



---

# Development of Gene Silencing Technique for Crop Protection Against Soil-borne Fungal Disease

## Authors

Guo Huishan, Gao Feng, Zhao Jianhua, and Zhang Bosen

# 发展基因沉默技术， 控制作物土传真菌病害\*



郭惠珊 高峰 赵建华 张博森

中国科学院微生物研究所 北京 100101

**摘要** 作物土传真菌病害是当前农业所面临的最重要问题之一，由于防治困难，正日趋成为限制我国农业生产可持续发展的重要因素。基因沉默（或RNA沉默，RNAi）是广泛存在于真核生物中，基于同源序列调控基因表达的一条重要途径，而由此发展起来的基因沉默技术，作为一种新防治策略被广泛地应用于防控植物有害生物的研究中。文章综合介绍了作物土传真菌病害的发生与防治现状、RNA沉默及其在植物有害生物防控应用的最新研究进展，客观分析了基因沉默技术在防治作物土传真菌病害的巨大潜力和亟需解决的主要问题，阐述了研发基因沉默技术对可持续控制作物土传真菌病害的重要性及其巨大应用前景。

**关键词** 作物，土传真菌病害，基因沉默

DOI 10.16418/j.issn.1000-3045.2017.08.003

## 1 作物土传真菌病害的发生及防治现状

土传病害是指由生活史中一部分或大部分存在于土壤中的病原在条件适宜时萌发并侵染植物、诱导病症的病害<sup>[1]</sup>，病原包括真菌、细菌、线虫、放线菌，其中真菌是最主要的类群。真菌引起的土传病害常会导致农作物产生根腐、萎蔫、枯死等症状，严重影响作物的生长发育和品质。近年来由于农作物连作严重、大量施用化肥以及气候变化等原因，造成农田土壤中微生态环境改变，土壤肥力下降；进而造成农作物土传真菌病害逐年加重。这给农业生产带来了巨大的经济损失，严重制约着我国农业生产的可持续发展<sup>[2]</sup>。

引起作物土传病害的真菌类群主要包括镰刀菌属（*Fusarium*）、轮枝菌属（*Verticillium*）、核盘菌属（*Sclerotinia*）、顶囊壳属（*Gaeumannomyces*）等。镰刀菌属中植物病原数量多，其中很大一部分依靠土壤传播，可以引起植物严重的根部和维管束病害。例如尖孢镰刀菌（*Fusarium oxysporum*）从根部侵染到达维管束后，能够引起作物严

\*资助项目：中科院战略性先导科技专项（B类）（XDB11040500）

修改稿收到日期：2017年5月10日

重的枯萎病; 植物在苗期感染常导致死苗, 成株期感染造成植株发育迟缓、叶片焦枯, 严重的会引起植株整株枯死; 该菌寄主范围广泛, 包括瓜类、茄科、葫芦科、豆科、花卉、经济作物、林果植物等 100 多种植物, 常常造成巨大的经济损失<sup>[3]</sup>。轮枝菌属中的 6 种植物病原真菌全部为土壤习居菌, 其中以大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae* Kleb.) 和黑白轮枝菌危害最重。例如大丽轮枝菌能引起约 660 种植物的黄萎病<sup>[4]</sup>, 其中棉花黄萎病, 仅在中国年发生面积就达 300 万公顷之多, 年经济损失约 12 亿元人民币<sup>[5]</sup>。由核盘菌属、链核盘菌属 (*Monilinia*)、丝核属 (*Rhizoctonia*) 和小菌核属 (*Sclerotium*) 等土传真菌引起的菌核病主要危害双子叶植物, 例如油菜、大豆、向日葵、花生等。该类病菌主要侵染植物的茎蔓、叶片和果实, 造成其腐烂坏死; 并且在重病株的茎秆和种荚内产生大量菌核<sup>[6,7]</sup>。菌核病在我国每年造成 10—30 亿元的经济损失, 发病严重区域作物减产近 50%<sup>[8]</sup>。禾顶囊壳 (*Gaeumannomyces graminis*) 是禾本科植物根部重要的寄生真菌, 在世界范围内可以引起许多禾谷作物、草坪杂草及禾本科牧草的全蚀病。由于不同寄主来源的病原菌对不同的禾本科植物致病力存在差异, 禾顶囊壳的 4 个变种分别是小麦变种、禾谷变种、玉米变种、燕麦变种<sup>[9-11]</sup>, 其中小麦变种对小麦侵染能力强、危害大、传播速度快, 常给小麦生产带来毁灭性打击, 被中国各小麦主产区列为检疫性病原。

作物土传真菌病害的种类多、分布广、发生重, 防治上困难重重。究其原因, 笔者认为主要有 3 点: (1) 与气传病害不同, 土传真菌病害多为积年流行病害, 初侵染原数量大, 病原大都长期在土壤中生活, 主要从植物根部组织侵染, 因此无法实现像对气传病害一样在侵染前期和初期等最佳防治时期, 进行大面积化学防治。(2) 土传真菌病害的病原在土壤中存活能力较强, 例如轮枝菌属和核盘菌属真菌形成的菌核具有很强的抗逆性, 一旦定植很难彻底根除。(3) 土壤中病原微生物种类较多, 经常会复合侵染, 致病机制复杂, 抗性种质资

源也相对缺乏。综上可以看出, 土传病害已成为病害防治中的一个难点, 探寻新的防治手段迫在眉睫。

## 2 RNA 介导的基因沉默原理及真菌中 RNA 沉默机制的研究进展

RNA 沉默是指能够在转录水平、转录后水平或者翻译水平引起序列特异性抑制基因表达的生物学现象<sup>[12]</sup>。RNA 沉默几乎存在于所有的真核生物中, 其机制保守且广泛地参与生物体的生长发育、异染色质形成以及应对生物与非生物胁迫等过程<sup>[13]</sup>。RNA 沉默由双链 RNA (dsRNA) 诱发, RNase III 型核酸酶 Dicer 蛋白识别并切割 dsRNA 前体产生长度为 21—30 nt 的 sRNAs; sRNA 进入 Argonaute (AGO) 蛋白形成 RNA 诱导的沉默复合体 (RNA-Induced Silence Complex, RISC); RISC 在 sRNAs 的指导下以序列特异性的方式在转录水平和转录后水平调控靶序列的表达<sup>[13-15]</sup>。

RNA 沉默首先于 1989 年在植物中被发现, 研究者观察到导入烟草的转基因发生失活现象<sup>[16]</sup>。次年有研究者在改变矮牵牛花色的试验中, 发现转基因来源的 RNA 能够作为诱发子引起序列特异性同源的植物内源基因表达的共抑制现象<sup>[17]</sup>。随后经过 10 年的研究, 1998 年植物科学家推测 dsRNA 可以诱导植物体内序列特异性的转录后基因沉默 (Post-Transcriptional Gene Silencing, PTGS) 过程<sup>[18]</sup>。同年 Fire 和 Mello<sup>[19]</sup>在秀丽线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中发现 dsRNA 是基因沉默的触发器, 并因此获得 2006 年诺贝尔生理学或医学奖。1999 年, Baulcombe 等<sup>[20]</sup>检测到植物中 RNA 沉默过程的关键决定因子——小 RNA 的存在。随后, RNA 沉默现象的机制和功能在动植物中都得到广泛而深入的研究。

而真菌的 RNA 沉默途径研究远落后于动植物, 只在几种模式真菌中有较深入的研究报道。例如, 在模式丝状真菌——粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 中发现与植物中类似的由外源转基因诱导的基因沉默, 被称之为 quelling (抑制)<sup>[21]</sup>。随后发现了影响 quelling 发生的一

系列 *qde* 突变体 (quelling deficient mutants) 并克隆了相关基因<sup>[22]</sup>。目前所知的在 *N. crassa* 的 quelling 通路中主要是 DNA 受到胁迫或损伤诱导产生的相关小 RNA (QDE-2-interacting sRNA, qiRNA)<sup>[23,24]</sup> 以及类似 microRNA (miRNA-like) 的小 RNA (miRNA)<sup>[25]</sup>。而 4 个主要 miRNAs 的合成途径各不相同, 功能也未知<sup>[25]</sup>。另一种模式真菌——卷枝毛霉菌 (*Mucor circinelloides*), 对其编码的 DCL (Dicer-like)、RdRP (RNA dependent RNA polymerase) 及 AGO 等 RNA 沉默途径相关蛋白也有一些相应的功能研究<sup>[26-31]</sup>。在 *N. crassa* 中, quelling 途径是沉默稳定基因组 DNA 转座子元件的重要机制<sup>[32]</sup>。Quelling 发生在无性阶段, 而在减数分裂时期, 由未配对的 DNA 引起的同源 RNA 沉默被称为 MSUD (Meiotic silencing by unpaired DNA)<sup>[22, 23]</sup>。裂殖酵母异染色质的形成也与 RNA 沉默途径相关<sup>[33]</sup>。另外, 在致病真菌 *Colletotrichum higginsianum*, *Cryphonectria parasitica* 和 *Aspergillus nidulans* 中, RNA 沉默机制是真菌抵抗真菌病毒的重要手段<sup>[34-36]</sup>。其他关于真菌 RNA 沉默的报道大多集中在小 RNA 测序及数据分析层面, 未有深入的机制报道, 所以真菌中 RNA 沉默途径的分子机制和生物学功能亟待进一步的研究。

### 3 应用基因沉默技术防控植物有害生物的研究进展

随着对 RNA 沉默机理的深入了解, RNA 沉默已发展成为现代基因调控技术并被广泛用于防治植物有害生物, 并且取得了显著的成果, 展现出良好的发展前景。害虫和病原微生物是限制植物生长发育的主要生物胁迫源。在植物中, 通过转入来自病毒基因组的反向重复序列, 可以诱导植物抗病毒基因沉默, 如转入木瓜环斑病毒片段的木瓜能够抵抗木瓜环斑病毒<sup>[37]</sup>。由于自然条件下, 植物受到多种病原的同时入侵, 通过模拟内源 miRNA 前体结构设计单个或多聚的人工 miRNA 前体, 表达高效靶向位点和多个目的基因的技术也被广泛地应

用于植物抗病毒过程<sup>[38-41]</sup>。还有通过直接注射或者让昆虫口服外源 dsRNA 来降低靶标基因的表达; 喂食带有目标靶向 RNA 干扰 (RNAi) 的转基因植物也被证明能减缓根癌线虫以及鳞翅目、鞘翅目昆虫的生长发育; 通过在寄主体内表达靶向棉铃虫 *CYP6AE14* 基因的 RNAi 构建实现了转基因棉花在大田中抵抗棉铃虫的应用<sup>[42,43]</sup>。

这种在植物寄主中表达靶向病原基因的 RNAi 载体, 沉默病原靶标基因, 从而使宿主获得对病原抗性的技术被称为寄主诱导基因沉默 (Host-Induced Gene Silencing, HIGS)。近十几年来, 利用 HIGS 在植物抵抗气传病原真菌领域已经有了一些概念性的研究和应用。例如, 利用在植物中表达靶向真菌葡聚糖转移酶基因或者真菌效应基因的 dsRNA, 减少白粉菌吸器的形成, 可以增强转基因植物对白粉菌的抗性<sup>[44]</sup>; 表达靶向丝裂原激活蛋白激酶、钙调磷酸酶调节亚基的小麦叶锈菌基因, 增强了小麦对叶锈菌的抗性<sup>[45]</sup>; 在拟南芥和番茄中表达靶向真菌 RNAi 蛋白基因 DCL 能降解灰霉菌的生长和致病性<sup>[46]</sup>。对于土传真菌病害, 在拟南芥和香蕉中表达靶向镰刀菌基因的 RNAi 也有效地增强了对枯萎病的抗性<sup>[47,48]</sup>。

最近, 笔者所在研究室在利用 HIGS 技术防治作物土传真菌病害——棉花黄萎病的研究中取得突破性进展, 不仅证明了 HIGS 在作物抗土传病原真菌的有效性, 同时从分子水平上证明了寄主表达产生的 RNAi 分子进入病原真菌, 降解目标病原基因的跨界 RNA 沉默。棉花黄萎病是我国棉花上最重要的病害, 是典型的土传病害, 其致病真菌为大丽轮枝菌, 由于防治难度大被称为“棉花癌症”。本研究室首先鉴定了大丽轮枝菌的疏水蛋白基因 *Hydrophobin1* (*VdH1*) 为潜在的致病因子, 敲除 *VdH1* 的突变体所引起的黄萎病的症状大幅减轻。因此, 以 *VdH1* 为靶向基因构建 RNAi 转化棉花, 得到了能够稳定表达目标小 RNA 的 RNAi 棉花。抗病检测显示, 相比于野生型, RNAi 棉花无论在实验室条件下, 还是大田病圃中都表现出高效的抗黄萎病的抗性<sup>[49]</sup>, 这表明棉

花能够利用 HIGS 沉默病菌中的靶标致病基因，从而降低黄萎病的发病率。进一步进行分子检测，从侵染 RNAi 棉花分离得到的病原菌中，检测到靶基因 *VdHI* 表达的下调及其相应的小 RNA 的积累<sup>[49]</sup>。这是国际上首次在分子水平上证明了宿主植物传输小 RNA 到真菌细胞中并诱导目标基因的沉默；也是 HIGS 在作物在自然病圃中有效防控土传真菌病害的首例报道。该研究成果为棉花黄萎病的可持续控制奠定了重要基础。

更为重要的是，本研究室近期又证明了棉花、番茄和拟南芥都能够转运植物自身的内源 miRNAs 到致病真菌细胞，并介导靶标基因的剪切，降解致病基因，从而降低大丽轮枝菌的致病性<sup>[50]</sup>。该研究也是国际上首次从分子水平揭示了宿主来源的小 RNA 跨界诱导病原基因沉默的基本原理，并为以上利用 HIGS 进行棉花抗黄萎病应用提供了重要的理论支持；而 HIGS 技术在抗病的成功应用<sup>[47-49]</sup>反过来也佐证了宿主小 RNA 跨界诱导真菌基因沉默的天然存在的抗病途径。

#### 4 基因沉默技术在作物土传真菌病害中的应用前景分析及展望

传统的化学农药控制方法对从根部侵染的病原菌几乎难以奏效，因此利用 HIGS 进行作物防控土传真菌病害正在吸引越来越多的科学家投身其中进行深入的探索<sup>[46-49]</sup>。不同病原菌的寄主植物产生 HIGS 的效率可能不尽相同，寄主植物中产生的小 RNA 在不同真菌细胞中起作用的方式也可能不同。如何采用合适的 RNAi 载体形式产生小 RNA 从而在不同的土传致病菌起作用，有赖于对特定真菌 RNA 沉默途径的了解和应用。真菌小 RNA 合成途径的多样性以及 RNA 沉默途径的分化<sup>[22,51]</sup>，土传真菌因其生活史和侵染机制的复杂性和研究的难度，都将给真菌 RNA 沉默途径的研究带来困难。但是，越来越多的真菌基因组测序已经完成或正在进行，对真菌基因功能的解析和对侵染过程及宿主抗病过程的深入了解，将会加速对真菌 RNA 沉默分子机理的了解。

或许利用真菌 RNA 沉默途径的多样性和分化，能让科学家设计出更多有效且特异的 HIGS 的载体，研发绿色、精准的抗土传真菌病害 RNAi 技术。同时基于对土传真菌致病机理的研究和致病基因的鉴定，设计多种 RNAi 载体和（或）多聚 RNAi 载体，靶向多个致病基因，将可以有效地降低病原物变异造成的抗病性丧失的几率，解决作物持久和广谱抗病难题。总之，基于 HIGS 的 RNAi 技术作为一个新的防治策略在作物抗土传真菌病害中正在呈现其极大的潜力。

当然，基因沉默技术从实验室走向生产实践，实际应用于防控作物土传真菌病害，还有很长的路要走。土壤微生态环境复杂，作物常常面临的是病原微生物的复合侵染，如何选择高效、特异的 RNAi 靶点，使作物获得高效抗性，还需对植物和土传病原真菌的互做机制进行更深入的解析。关于宿主诱导基因沉默的机制，目前大多研究仅限于模式生物，关于不同物种中 RNAi 的差异性、RNAi 在不同物种间的跨界调控机理等理论问题的最终突破尚需时日。另外，植物根系富集大量微生物群体，包括真菌、细菌和卵菌等，这些微生物群落与植物根系存在紧密互作，共同进化。越来越多的实验证实，不同物种间普遍存在包括水份、营养物质、病毒、蛋白以及 RNA 等的物质传递<sup>[52-55]</sup>。土壤微生物组学的研究将有利于探讨组成微生态环境的微生物之间的相互作用，以及共同维持生态平衡及其对植物生长及抗病的影响。对物种间物质交换机制以及微生物群落与植物互作机制的深入探讨，能够指导 HIGS 技术在实际应用中高效靶标的筛选。同时，对于微生态环境整体的研究，有利于在 HIGS 技术应用过程中保护益生菌，防治病原菌，发展可持续的生态农业。微生物组学的研究，必将为 HIGS 技术的应用提供更全面的理论基础。我国科学家应该集中力量，以优势作物的重点病害为突破口，全力以赴，在理论和应用研究探索中齐头并进，尽早使基因沉默技术防控作物土传真菌病害从理论研究走向大规模农业生产实践。

综上所述，针对目前在防治上困难重重的土传真菌病害，基因沉默技术是对传统防治策略的一个重要补充，尤其对于没有抗性资源的物种，HIGS 更显其得天独厚的优势。因此，利用基因沉默技术可持续控制作物土传真菌病害将是未来植物保护学领域的重点攻关方向。

### 参考文献

- Bockus W W, Shroyer J P. The impact of reduced tillage on soilborne plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, 1998, 36: 485-500.
- Li H, Huang J, Yuan H. Advances in control of plant soil-borne diseases by organic amendments. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2002, 32(4): 289-295.
- Correll J C. The relationship between formae speciales, races, and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. *Phytopathol Z*, 1991, 81(9): 1061-1064.
- Bhat R G, Subbarao K V. Host Range Specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 1999, 89(12): 1218-1225.
- 朱荷琴, 冯自力, 尹志新, 等. 我国棉花黄萎病菌致病力分化及 ISSR 指纹分析. *植物病理学报*, 2012, 42(3): 225-235.
- Boland G J, Hall R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 1994, 16(2): 93-108.
- Bolton M D, Thomma B P, Nelson B D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 2006, 7(1): 1-16.
- 牛伯庆, 汪文静, 谢响明. 菌核病防治研究进展. *生命科学研究*, 2011, (06): 537-541.
- Bateman G L, Ward E, Antoniw J F. Identification of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *G. graminis* var. *avenae* using a DNA probe and non-molecular methods. *Mycological Research*, 1992, 96(9): 737-742.
- Walker J. Take-all disease of Gramineae: a review of recent work. *Review of Plant Pathology*, 1975, 54(3): 113-144.
- Wong P. Cross-protection against the wheat and oat take-all fungi by *Gaeumannomyces graminis* var. *Soil Biology & Biochemistry*, 1975, 7(3): 189-194.
- Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 2004, 431(7006): 343-349.
- Plasterk R H. RNA silencing: the genome's immune system. *Science*, 2002, 296(5571): 1263-1265.
- Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature*, 2004, 431(7006): 356-363.
- Baulcombe D. RNA silencing. *Trends Biochem Sci*, 2005, 30(6): 290-293.
- Matzke M A, Primig M, Trnovsky J, et al. Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *EMBO J*, 1989, 8(3): 643-649.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hamilton A J, Baulcombe D C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 1999, 286(5441): 950-952.
- Romano N, Macino G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol*, 1992, 6(22): 3343-3353.
- Chang S S, Zhang Z, Liu Y. RNA interference pathways in fungi: mechanisms and functions. *Annu Rev Microbiol*, 2012, 66: 305-323.

- 23 Shiu P K, Raju N B, Zickler D, et al. Meiotic silencing by unpaired DNA. *Cell*, 2001, 107(7): 905-916.
- 24 Lee H C, Chang S S, Choudhary S, et al. qiRNA is a new type of small interfering RNA induced by DNA damage. *Nature*, 2009, 459(7244): 274-277.
- 25 Lee H C, Li L, Gu W, et al. Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi. *Mol Cell*, 2010, 38(6): 803-814.
- 26 Calo S, Nicolas F E, Vila A, et al. Two distinct RNA-dependent RNA polymerases are required for initiation and amplification of RNA silencing in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Mol Microbiol*, 2012, 83(2): 379-394.
- 27 Campo S, Gilbert K B, Carrington J C. Small RNA-based antiviral defense in the phytopathogenic fungus *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS Pathog*, 2016, 12(6): e1005640.
- 28 Cervantes M, Vila A, Nicolas F E, et al. A single argonaute gene participates in exogenous and endogenous RNAi and controls cellular functions in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69283.
- 29 Nicolas F E, De Haro J P, Torres-Martinez S, et al. Mutants defective in a *Mucor circinelloides* dicer-like gene are not compromised in siRNA silencing but display developmental defects. *Fungal Genet Biol*, 2007, 44(6): 504-516.
- 30 Nicolas F E, Moxon S, De Haro J P, et al. Endogenous short RNAs generated by Dicer 2 and RNA-dependent RNA polymerase 1 regulate mRNAs in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(16): 5535-5541.
- 31 Torres-Martinez S, Ruiz-Vazquez R M. RNAi pathways in *Mucor*: A tale of proteins, small RNAs and functional diversity. *Fungal Genet Biol*, 2016, 90: 44-52.
- 32 Nolan T, Cecere G, Mancone C, et al. The RNA-dependent RNA polymerase essential for post-transcriptional gene silencing in *Neurospora crassa* interacts with replication protein A. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(2): 532-538.
- 33 Ebert A, Lein S, Schotta G, et al. Histone modification and the control of heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. *Chromosome Res*, 2006, 14(4): 377-392.
- 34 Segers G C, Zhang X, Deng F, et al. Evidence that RNA silencing functions as an antiviral defense mechanism in fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(31): 12902-12906.
- 35 Sun Q, Choi G H, Nuss D L. A single Argonaute gene is required for induction of RNA silencing antiviral defense and promotes viral RNA recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(42): 17927-17932.
- 36 Zhang X, Segers G C, Sun Q, et al. Characterization of hypovirus-derived small RNAs generated in the chestnut blight fungus by an inducible DCL-2-dependent pathway. *J Virol*, 2008, 82(6): 2613-2619.
- 37 Sanford J, Johnston S. The concept of parasite-derived resistance—Deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology*, 1985, 113(2): 395-405.
- 38 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.
- 39 Duan C G, Wang C H, Guo H S. Application of RNA silencing to plant disease resistance. *Silence*, 2012, 3(1): 5.
- 40 Qu J, Ye J, Fang R. Artificial microRNA-mediated virus resistance in plants. *J Virol*, 2007, 81(12): 6690-6699.
- 41 Schwab R, Ossowski S, Riester M, et al. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2006, 18(5): 1121-1133.
- 42 Baum J A, Bogaert T, Clinton W, et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(11): 1322-1326.
- 43 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(39): 14302-14306.



- 44 Nowara D, Gay A, Lacomme C, et al. HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *Plant Cell*, 2010, 22(9): 3130-3141.
- 45 Panwar V, Mccallum B, Bakkeren G. Host-induced gene silencing of wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* pathogenicity genes mediated by the *Barley stripe mosaic virus*. *Plant Mol Biol*, 2013, 81(6): 595-608.
- 46 Wang M, Weiberg A, Lin F-M, et al. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature Plants*, 2016, 2(10): 16151.
- 47 Ghag S B, Shekhawat U K, Ganapathi T R. Host-induced post-transcriptional hairpin RNA-mediated gene silencing of vital fungal genes confers efficient resistance against *Fusarium wilt* in banana. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12(5): 541-553.
- 48 Hu Z, Parekh U, Maruta N, et al. Down-regulation of *Fusarium oxysporum* endogenous genes by Host-Delivered RNA interference enhances disease resistance. *Front Chem*, 2015, 3: 1.
- 49 Zhang T, Jin Y, Zhao J H, et al. Host-induced gene silencing of the target gene in fungal cells confers effective resistance to the cotton wilt disease pathogen *Verticillium dahliae*. *Mol Plant*, 2016, 9(6): 939-942.
- 50 Zhang T, Zhao Y L, Zhao J H, et al. Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen. *Nat Plants*, 2016, 2(10): 16153.
- 51 Nicolás F E, Torresmartínez S, Ruízváquez R M. Loss and retention of RNA interference in fungi and parasites. *Plos Pathogens*, 2013, 9(1): 430-445.
- 52 Chaloner T, Van Kan J A, Grant-Downton R T. RNA 'Information Warfare' in pathogenic and mutualistic interactions. *Trends Plant Sci*, 2016, 21(9): 738-748.
- 53 Kim G, Leblanc M L, Wafula E K, et al. Plant science. Genomic-scale exchange of mRNA between a parasitic plant and its hosts. *Science*, 2014, 345(6198): 808-811.
- 54 Koch A, Biedenkopf D, Furch A, et al. An RNAi-based control of *Fusarium graminearum* infections through spraying of long dsRNAs involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery. *PLoS Pathog*, 2016, 12(10): e1005901.
- 55 Soanes D, Richards T A. Horizontal gene transfer in eukaryotic plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, 2014, 52: 583-614.

## Development of Gene Silencing Technique for Crop Protection Against Soil-borne Fungal Disease

Guo Huishan Gao Feng Zhao Jianhua Zhang Bosen

( Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China )

**Abstract** Crop disease caused by soil-borne fungal pathogens is one of the major threatens to agriculture nowadays. Due to the lack of efficient control method, it is becoming a key factor to restrict sustainable development of agricultural production in China. Gene silencing (or RNA silencing, RNAi) is an important pathway in eukaryotes that regulates gene expression based on sequence homology. Gene silencing-based technology has been widely used as a new strategy for plant protection. In this review, we summarized occurrence and general prevention method of crop disease caused by soil-borne fungi, and introduced recent advances and applications of RNA silencing in crop protection. By deeply discussing potential values and problems of gene silencing technology for controlling soil-borne fungal pathogens, we point out the advantages and great importance in exploiting gene silencing-based technology for sustainable control of soil-borne fungal pathogens.

**Keywords** crop, soil-borne fungal disease, gene silencing

**郭惠珊** 中科院微生物所研究员，博士生导师。2004年入选中科院“百人计划”，2005年获国家自然科学基金委员会“杰出青年科学基金”资助。2015年获国务院政府特殊津贴。中科院特聘核心骨干。中科院微生物所、植物基因组学国家重点实验室、海南热带生物资源可持续利用重点实验室学术委员会委员；中科院微生物所学位评定委员会、研究组长委员会、学术道德与权益委员会委员；中国植物病理学会理事。担任 *PLoS Pathogens*, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *BMC genomics*, *Molecular Plant Pathology* 等刊物编委。在 *Nature*, *Nature Plants*, *The EMBO Journal*, *The Plant Cell*, *PLOS Pathogens*, *The Plant Journal*, *Journal of Virology*, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *FEBS Letters* 等国际顶级学术期刊发表研究论文60余篇。E-mail: guohs@im.ac.cn

**Guo Huishan** Received Ph.D. degree from Centro Nacional de Biotecnología CSIC, Universidad Autónoma de Madrid, Spain in 1996. Her current research interests are in RNA silencing and dissecting the disease resistance in plant. From 1997 to 1998, as a postdoctoral fellow, she worked in Centro Nacional de Biotecnología CSIC, Universidad Autónoma de Madrid, Spain. From 1998 to 2001, as a research fellow, she worked in Institute of Molecular Agrobiology, National University of Singapore. From 2001 to 2003, she worked in Temasek Life Sciences Laboratory, National University of Singapore. From 2003 to 2004, as Acting Principal Investigator, she worked in Temasek Life Sciences Laboratory, Singapore. Since 2004, she has been a Principle Investigator, the “Hundred Talents” Program of Chinese Academy of Sciences, Institute of Microbiology, CAS (IMCAS), China. She received “Outstanding Youth Scientist Award (National Natural Science Foundation of China)” in 2005. She is currently the member of the 8th Academic Committee of IMCAS, the member of Academic Ethics and Equity Committee of IMCAS, the member of the 10th Council of Chinese Society of Plant Pathology. Currently, Dr. Guo Huishan is the associate editor of *PLoS Pathogens*, *BMC Genomics*, and *Molecular Plant Pathology*. She has published 60 academic papers in top tier international journals. E-mail: guohs@im.ac.cn