

RNA 干扰技术及在植物抗病研究中的应用

王志坤, 李文滨, 刘珊珊

(东北农业大学大豆所, 大豆生物学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要: RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术是一项基因沉默新技术, 自 20 世纪 90 年代被发现以来, 现在已逐渐成为分子生物学和细胞生物学的有用工具之一。目前该技术已被广泛应用到植物功能基因组研究和植物抗病毒病研究中, 在抗线虫病研究中应用较少。现综述了 RNAi 的分子机制、基因沉默的主要类型以及该技术在植物抗线虫病和抗病毒病研究中的应用。

关键词: RNAi; 作用机制; 基因沉默; 抗线虫; 抗病毒病

中图分类号: S565.101

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2008)03-0521-06

Technology of RNAi and Its Application in Disease Resistance of Plant

WANG Zhi-kun, LI Wen-bin, LIU Shan-shan

(Soybean Research Institute of Northeast Agricultural University, Chinese Education Ministry's Key Laboratory of Soybean Biology, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: The technology of RNA interference(RNAi) is a new technology of gene silencing. Since RNAi was found in 1990s, it has been one of the most useful tool for molecular and cellular biology. RNAi has been applied in plant functional genomics and antivirus, but few applications in control plant parasitic nematodes were elucidated. In this review, we elucidated RNAi molecular mechanism, types of gene silencing and its application in control of plant parasitic nematodes and plant virus.

Key words: RNA interference; Molecular mechanism; Gene silencing; Control of plant parasitic nematodes; Antivirus

1990 年 Napoli^[1]等发现, 将查耳酮合酶基因由强启动子驱动转入矮牵牛后, 自身和内源的查耳酮合酶基因都发生沉默, 他们称这种现象为共抑(Co-suppressing), 并推断共抑制可能是由 RNA 介导的。1995 年, Guo 等在利用反义 RNA 技术研究线虫(*C. elegans*)的 *par1* 基因功能时, 发现了 RNAi 现象^[2]。1998 年华盛顿卡耐基研究院的 Fire 详细阐明了这种现象是由于在制备正义/反义 RNA 时混入了少量的 dsRNA 引起的, 并称这种现象为 RNA 干扰^[3]。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指利用外源导入或转录载体在体内转录的双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)介导受体细胞中的序列特异的同源性 mRNA 发生降解或翻译受阻, 引发受体细胞产生转录后基因沉默, 使与此相应的内源靶基因的表达被阻抑, 从而得到类似于“基因敲

除”的基因阻抑效果。它是生物体抵御外来感染的一种重要保护机制。为此 RNAi 被 Science 评为 2001 年最重要的成果之一, 2002 年 Nature 杂志亦将 RNAi 评为年度重大科技成果之一。由于对 RNAi 的突出贡献, Andy Fire 获得了 2006 年的诺贝尔医学/生理学奖。迄今, RNA 干扰现象已经在许多生物体内发现, 包括植物、真菌、低等无脊椎动物和哺乳动物。可以推测, RNAi 现象可能是生物界一种古老而且进化上高度保守的重要现象^[4]。

1 RNAi 的分子作用机制

经过众多学者的研究, 现已基本阐明了 RNAi 的作用机制。植物、线虫中 RNAi 主要是转录后水平的基因沉默。

转录后水平的 RNAi 机制是在对线虫、果蝇等

收稿日期: 2008-01-22

基金项目: 黑龙江省博士后资助项目(LBH-Z07247)。

作者简介: 王志坤(1978-), 女, 助理研究员, 博士, 主要从事大豆遗传改良与分子生物学基础研究。E-mail: zhikunwang1998@yahoo.com.cn。

通讯作者: 李文滨, 教授, 博士生导师。E-mail: wenbinli@yahoo.com。

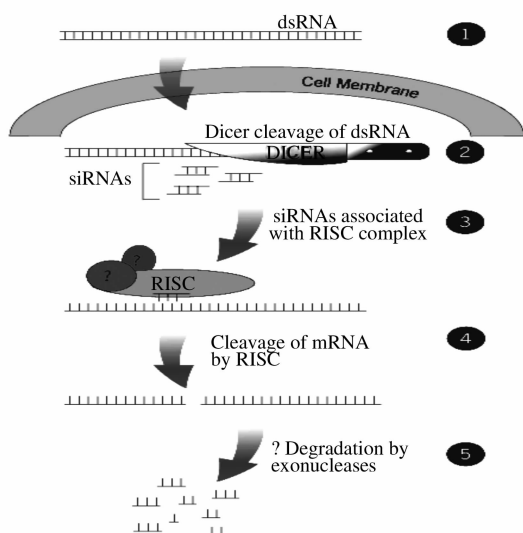


图1 RNAi 作用机制模型

Fig. 1 The model of RNAi mechanics

生物体进行研究而进一步推导得出来的。不同研究领域的学者相继提出了多种 RNAi 机制的模型,这些模型大致都将 RNAi 分为两个阶段:起始阶段和效应阶段。

起始阶段包括:①dsRNA 的导入:包括由外源导入或由转基因、转座子、病毒感染等各种方式引入的 dsRNA;②dsRNA 在细胞内被一种命名为 Dicer 的酶切割成 21 ~ 23 nt 长的小分子干扰 RNA 片断 (short interfering RNA, siRNA)。

效应阶段包括:①在 siRNA 反义链指导下,双链 siRNA 与一个不同于 DICER 的 RNA 酶结合形成沉默复合物 RISC。②siRNA 双链解旋,正义链被释放出来,RISC 被激活。③活化的 RISC 通过碱基配对识别互补的靶 mRNA,siRNA 反义链与 mRNA 复合体中换位,并在距 siRNA 的 3'末端 12 nt 处切割靶 mRNA,从而实现了 mRNA 的降解。降解位点多位于尿嘧啶。

RNAi 过程中还具有自身循环放大机制,并将其归为模型的第三阶段——循环放大阶段,其机制大致如下:

在效应阶段,活化的 RISC 结合 mRNA 后,内切核酸酶将 mRNA 切割成 12 ~ 23 nt 的片段,特异性地抑制了靶基因表达。同时,释放出来的 siRNA 可以作为一种特殊引导物,在 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RdRP) 作用下,以靶 mRNA 为模板合成新 dsRNA,后者又被降解为新的 siRNA,进入上述循环,呈放大效应。此过程又称为随机降解性多聚酶链式反

应 (PCR) [5]。

2 植物中常用的 RNA 干扰技术

目前 RNAi 的应用在动植物种采用的方法差异较大,在动物中由于长链的 dsRNA 诱导 PKR 途径非特异性降解 dsRNA,因此动物研究一般采用 siRNA 的方式产生基因沉默;而在植物中由于细胞壁的限制,使注射、饲喂等方法将 siRNA 导入植物细胞非常困难,因此植物中普遍采取 dsRNA 的方式产生 RNAi。常用的 RNAi 技术按引起 RNAi 的持续时间的不同可分为瞬时性 RNA 沉默和持久性的 RNA 干扰。

2.1 瞬时性的 RNAi

导致产生瞬时性 RNA 沉默的方法包括基因枪轰击法和病毒侵染法。基因枪轰击法是利用金弹或钨弹颗粒包裹设计好的 dsRNA 轰击目标植物组织,强行穿透植物细胞壁获得 RNA 沉默的方法。该方法的优点是速度快,并且没有生物学限制;缺点是导入组织或细胞的 dsRNA 效率比较低,并且这种基因沉默作用不能遗传而仅限于被轰击的组织或细胞。

病毒诱导的基因沉默 (virus induced gene silencing, VIGS) 是利用改造的病毒作为载体,这种改造的病毒没有致病能力或只表现出很轻的病症,并且具有复制的能力,然后把这种载体通过农杆菌介导或用基因枪的方法,就可以把目的基因序列导入宿主内,病毒便在植物内复制和传播,从而诱导基因沉默。通常进行 VIGS 时利用目的基因的 300-800 bp 片段可达到很好的沉默效果,但片段长度在 23-60 bp 时也被证实是有效的。目前已经开发出的用于 VIGS 载体的有 TMV 载体、PVX 载体和 TRV 载体等,利用不同的 VIGS 载体对于报告基因 *GUS* 或 *GFP* 或内源的 *PDS* 基因都得到很好的沉默效果。这种方法的优点是随着病毒自身的复制能使 dsRNA 高水平表达,并且这种方法一般是瞬时分析法避免了需要培植转基因植物的艰苦,但是到目前为止大部分的 VIGS 载体仅在双子叶植物中发挥作用,在单子叶植物中的载体还需要进一步的研究和开发。

2.2 持久性的 RNAi

目前,在植物中持久表达 RNAi 通常采用构建表达载体,通过 PEG 介导、电穿孔介导、农杆菌侵染等方法使设计的序列整合到植物基因组中并稳定表达。由于农杆菌侵染法技术的成熟,在持久性的

RNA 沉默研究中得到了广泛应用。对于 RNAi 的持久性, Stoutjesdijk 等^[6]报道拟南芥中到 T₃ 代时 RNAi 仍然是遗传稳定性的。构建 hpRNA 高效表达载体用于特定基因沉默是研究的热点之一。Wesley 等^[7]系统研究了不同结构的 RNA 对沉默效率的影响, 发现相比于单链正义或反义 RNA, 双链 RNA 尤其是发夹式结构的 RNA (hpRNA) 对 RNA 干扰的效率又非常显著的提高。如果在发夹结构的反向重复序列间加入一段非编码序列如内含子, 在植物体内转录形成含内含子的发夹结构 (intron splicing hpRNA, ihpRNA), 则沉默效果与 hpRNA 相比可从 58% 提高到 90%。

3 RNAi 技术在植物抗病虫研究中的应用

3.1 RNA 干扰技术在植物抗线虫研究中的应用

线虫病害给全世界农业每年带来近 1250 亿美元的经济损失^[8], 对线虫的防治现在主要依靠化学杀虫剂、轮作和抗病品种三个措施。化学杀虫剂由于对环境的危害以及高成本, 已经被限制使用; 轮作虽可作为一种有效措施来防治限定寄主范围的寄生线虫, 但如轮作的非寄主作物具有较少的经济价值, 那么也将引起潜在的经济损失。抗病品种的选育是控制线虫病害较为有效的措施。目前防治线虫病害方法的不理想, 给利用转基因方法培育抗线虫品种提供了有利机会^[9]。

植物寄生线虫可以通过取食管吸取 dsRNA, 这个发现使高通量研究线虫基因功能成为可能。Urwinn 和同事们^[10]通过让植物寄生线虫摄取 dsRNA 分子从而引发线虫中相应基因沉默, 证实了 RNAi 机制在植物寄生线虫 (*Heterodera glycines* 和 *Globodera pallida*) 中存在。从那时起, RNAi 就开始用来鉴定植物寄生线虫的基因功能^[11-15]。

转基因植株在体内表达寄生线虫特异靶基因的 dsRNA, 寄生线虫通过摄取植物细胞质将这些 dsRNA 或 siRNA 从植物体内传递到线虫体内。一旦 dsRNA 或 siRNA 进入线虫体内, 线虫自身 RNAi 机制将使线虫体内的靶基因沉默, 从而影响寄生线虫的表型, 达到抗线虫目的 (图 2)。

图 2 中的转基因植物表达线虫特异靶基因的 dsRNA (a)。植物体内 DICER 酶 (b) 加工 dsRNA 形成 siRNAs (c)。当线虫 (d) 从植物细胞中吸取养分时也摄食 dsRNA 或 siRNAs。如果线虫摄取了长的

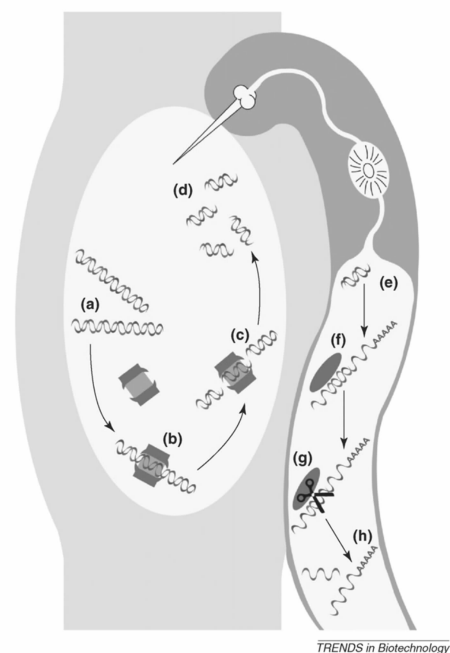


图 2 植物中表达 dsRNA 能够引起寄生在植物体内的线虫发生 RNA 沉默

Fig. 2 Double-stranded (ds) RNA produced in the plant can lead to RNA silencing in plant-parasitic nematodes dsRNA, 线虫体内的 DICER 酶会把 dsRNA 加工成 siRNAs。siRNAs (e) 被线虫 RISC 复合物识别后, 正义与反义链解旋。部分载满反义链的 RISC 复合物与线虫相应的 mRNA 相互作用 (f), 使 mRNA 断裂 (g) 并降解 (h)。另外, 靶 mRNA 与 siRNAs 结合后也能形成双链, 并且这些 dsRNA 接着能够被加工形成更多的 siRNAs, 扩大了最初的沉默信号。在植物和线虫中, RNA 沉默也能产生通过细胞边界相互传递的系统信号^[16]。该策略的应用有助于更好的理解植物寄生线虫的功能基因组, 更好的防治病原菌和可能的其它一些昆虫病害。近来, 已有文献报道利用 RNAi 技术防治植物寄生线虫。

Huang 等^[17]将根结线虫 16D10 基因的 hpRNA 结构转入拟南芥, 该基因编码一个保守的根结线虫分泌肽, 其功能是个假定的植物转录因子的配体。生物学检测发现转基因植株与对照植株相比, 根结线虫卵的数量下降了 69% ~ 93%。而且, 可以同时抗 4 个主要的根结线虫种 (*M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla*)。Northern 杂交在转基因株系中检测到有 16D10 基因的 dsRNA 结构表达, 并加工成 siRNA。T₂ 代转基因植株对根结线虫也有较高抗

性。目前发现的抗根结线虫基因都不具备如此的广泛有效的抗性,因此该方法提供了一种高效的抗根结线虫的新策略。

Yadav 等^[18]将编码根结线虫特异联接因子和整合酶的管家基因的发夹式 RNAi 质粒转入烟草植株,研究结果证明,表达 dsRNA 的转基因烟草对根结线虫具有很高抗性(92%),证实利用 RNAi 方法控制植物寄生虫是一个十分有效的策略。而且,该方法也可作为分析寄生虫基因功能的一个强有力的工具。由于它们寄生的本性,这些寄生虫非常顽抗传统的遗传调控方式。因而,仅有一小部分基因的功能被确定下来。因为植物本身存在 RNAi 机制,植物可能通过产生或扩大 siRNAs 来激发寄生线虫的 RNAi 机制,植物寄主产生的 siRNAs 更容易通过摄取食物管进入寄生虫体内。

Steeves 等^[19]也利用寄主产生的干扰分子诱导大豆胞囊线虫 RNAi,阻断大豆胞囊线虫的生活周期。选择的靶基因是编码线虫 MSP 蛋白的 *MSP* 基因,该蛋白质是线虫特异的,决定线虫精子运动和繁殖的关键蛋白^[20-21]。转基因大豆植株的 Northern 杂交分析发现有特异 MSP siRNA 分子出现,转基因大豆植株的 T₀ 代生物学检测发现每克大豆根组织的胞囊数减少了 68%。而且,对能够成功寄生在转基因植株上的大豆胞囊线虫的后代又进行生物学检测,发现其后代线虫的繁殖力被大大削弱,每克根组织的胞囊数减少了 75%。该研究不仅证实了沉默大豆胞囊线虫 *MSP* 基因可以有效阻断大豆胞囊线虫的生活周期,而且又一次证实了以 RNAi 为基础的策略对防治大豆胞囊线虫具有巨大的潜力。

Fairbairn 等^[22]构建了根结线虫 (*Meloidogyne javanica*) 靶基因 *MjTis11* 不同发夹结构的 RNAi 质粒,通过农杆菌介导法转入烟草植株,获得表达不同 hpRNA 结构的转基因植株。结果表明寄生在转基因烟草植株的线虫体内的 *MjTis11* 基因被持续沉默,而且这种基因沉默是 *MjTis11* 特异的,线虫体内其它不相关的基因序列不受任何影响。能够诱导 *MjTis11* 沉默的转基因植株体内均都有 siRNAs 存在。尽管下调表达 *MjTis11* 基因并未得到完全抗线虫植株,但该研究证实了通过在寄主植株中表达靶基因 dsRNA 能够沉默根结线虫相应基因。这种方法不仅仅是用于抗寄生线虫的研究,也适合其它靠食植物为生的害虫。

虽然利用 RNAi 方法在抗植物寄生线虫方面取得了一定成果,证实了该抗线虫策略是十分有效的,但也有一些实验室在研究该问题时遇到许多阻碍^[28]。是什么原因导致这样的差异呢?第一,已经被证实 RNAi 的有效性依赖于许多因素,如靶基因的表达方式和表达水平,dsRNA 片段的大小、序列组成及它在靶基因中的位置等。^[23-24]第二,植物中没有产生 dsRNA 的靶 mRNA 将阻碍沉默信号的扩大,因此,利用强启动子获得高表达产物是线虫 RNAi 成功所必需的。虽然 35S 启动子在线虫饲喂点下调表达,但已经被证实适合用作该方法的启动子,其他启动子可能太弱了。第三,一个关键的问题是线虫是否能够摄取植物细胞内表达的 dsRNA 或 siRNA 分子。根结线虫和胞囊线虫在细胞内通过一种叫吸食管的特殊结构来摄取食物^[25],这个吸食管具有分子筛作用,用来帮助阻止线虫从植物中摄取大分子物质。具体排阻限大小还不十分确定,但利用荧光蛋白 (GFP, 28kDa) 和不同染料指示排阻限大小在 20-40kDa^[26-27]。暗示线性 dsRNA 以及长度在 21-23bp 大小的双链干扰 RNAs (siRNA) 能够被摄取^[26]。研究表明根结线虫比胞囊线虫能够摄取较大的分子,胞囊线虫摄取食物的大小可能接近于排阻限大小,因此,目前胞囊线虫 RNAi 的成功率要低于根结线虫的成功率。第四,目的基因的选择也十分重要,应选择影响线虫生长发育的关键基因,沉默该基因会导致线虫致死或严重影响线虫生长繁育,从而达到抗线虫的目的。

3.2 RNAi 技术在植物抗病毒研究中的应用

将病毒的某一序列设计成双链结构导入植物体使之表达,可诱发 RNA 沉默强化植物体内天然的 RNA 沉默抗病毒能力,这使得高抗病毒性的转基因植物的获得成为可能。

1999 年南方菜豆花叶病毒属的水稻黄斑驳病毒 (Rice yellow mottle virus, RYMV) 在非洲广泛流行,Pinto 等^[29]将该病毒复制所需酶的部分基因通过构建载体而转化水稻,诱发基因沉默,从而使植物具有 RYMV 的抗性,并且这种抗性能稳定遗传 3 代。

Wang 等^[30]利用大麦黄萎病毒 (Barley yellow dwarf virus, BYDV) 的复制酶基因片段为靶位点,将其设计成反向重复序列构建成可产生发夹结构的载体,并将该载体导入大麦,在 25 个转化系中,有 9 个

转化系表现出强的抗性,并且稳定遗传的 2 个株系后代中,用酶联免疫吸附法检测不到接种病毒的存在。

Tenllado 等^[31-32]用三种典型的正义单链 RNA 病毒——烟草花叶病毒属的辣椒轻型斑驳病毒 (Pepper mild mottle virus, PMMoV)、马铃薯 Y 病毒属的烟草蚀斑病毒 (Tobacco etch virus, TEV) 以及苜蓿花叶病毒属的苜蓿花叶病毒 (Alfalfa mosaic virus, AMV), 分别以直接注射和农杆菌转化两种方式将病毒复制酶基因部分序列来源的 dsRNA 导入植物叶片细胞, 结果发现两种方式都成功阻止 PMMoV、TEV 和 AMV 这三种病毒的侵染过程。

Kalantids 等^[33]将黄瓜花叶病毒 (Cucumber mosaic virus, CMV) 部分基因的 cDNA 反向重复序列导入烟草中, 并且检测到一个完全抗 CMV 的株系, 证实烟草病毒抗性与 siRNA 的产生直接相关。

Shuichiro Takahashi 等^[34]报道分别以马铃薯 X 病毒 (Potato virus X, PVX) 的外壳蛋白基因和 *TGBp1* 基因 (这个基因编码 RNA 沉默抑制因子) 为靶位点来设计 siRNA, 他们分别选取了这两个基因的一部分序列, 在体外以 PCR 的方法合成其正义链与反义链, 然后把正义链与反义链反向连接在载体上, 这样能保证在转录时容易形成发夹 RNA。结果显示这两种 siRNA 都能干扰 PVX 的侵染, 但是用 PVX 的 *TGBp1* 基因序列设计的 RNAi 作用靶位点所产生的干扰效果明显好于用外壳蛋白基因作为 RNAi 作用靶位点。

虽然科学家们在这方面做的工作比较多, 但到目前为止还没取得突破性的进展, 也就是没能大规模应用于实际生产中。

4 小结

RNAi 技术已经作为一种新的技术方法, 在各个生物研究领域内广泛应用并取得了很多重要成果。因为 RNAi 和物化诱变、插入突变相比有其独特的优势, 而植物存在多基因家族或多倍体现象, 所以 RNAi 技术在作物遗传育种中可以敲除不良基因, 创造新变异、新基因型。利用 RNAi 技术创制抗病虫新种质是一种新的抗病虫研究策略, 前人已证实该方法的可行性及有效性。目前该方法在抗病毒病的研究中应用较多, 在抗线虫病和抗细菌性病害的研究中只见少数文献报道, 而在抗真菌性病害的研究

中未见相应文献报道。利用 RNAi 技术获得的抗性植株与直接转入抗性基因的抗性植株相比具有更高的生物安全性、高效性和特异性, 免除了寻找抗病基因的艰苦工作, 具有更广阔的应用前景。随着 RNAi 机制研究的深入和 RNAi 技术的日趋完善, 人们将在生物学研究及应用中开辟一片新天地, 该技术将被更广泛地用于各个生物研究领域, 将带来巨大的科研、经济和社会价值。

参考文献

- [1] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible cosuppression of homologous gene in trans [J]. *Plant Cell*, 1990, 2: 279-289.
- [2] Guo S, Kempthues K J. Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed [J]. *Cell*, 1995, 81(4): 611-620.
- [3] Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, et al. Potent and specific interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391: 806-811.
- [4] 王贤, 滑冰. RNA 干扰作用及其技术 [J]. 周口师范学院学报, 2003, 20(5): 47-50. (Wang Xian, Hua Bing. RNA interference and technology [J]. *Journal of Zhoukou Teachers College*, 2003, 20(5): 47-50.)
- [5] Lipardi C, Wei Q, Paterson B M. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs [J]. *Cell*, 2001, 107(3): 297-307.
- [6] Stoutjesdijk P A, Singh S P, Liu Q, et al. hpRNA-mediated targeting of the *Arabidopsis FAD2* gene gives highly efficient and stable silencing [J]. *Plant Physiology Preview*, 2002, 129: 1-9.
- [7] Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A, et al. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants [J]. *Plant Journal*, 2001, 27(6): 581-590.
- [8] Chitwood D J. Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service [J]. *Pest Management Science*, 2003, 59: 748-753.
- [9] Atkinson H J, Urwin P E, McPherson M J. Engineering plants for nematode resistance [J]. *Annual Reviews in Phytopathology*, 2003, 41: 615-639.
- [10] Urwin P E, Lilley C J, Atkinson H J. Ingestion of double-stranded RNA by parasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2002, 15: 747-752.
- [11] Bakhtia M, Charlton W, Atkinson H J, et al. RNA interference of dual oxidase in the plant nematode *Meloidogyne incognita* [J].

- Molecular Plant-Microbe Interactions, 2005, 18: 1099-1106.
- [12] Chen Q, Rehman S, Smant G, et al. Functional analysis of pathogenicity proteins of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* using RNAi [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2005, 18: 621-625.
- [13] Fanelli E, Di Vito M, Jones J T, et al. Analysis of chitin synthase function in a plant parasitic nematode, *Meloidogyne artiellia*, using RNAi [J]. Gene, 2005, 349: 87-95.
- [14] Lilley C J, Goodchild S A, Atkinson H J, et al. Cloning and characterization of a *Heterodera glycines* aminopeptidase cDNA [J]. International Journal for Parasitology, 2005, 35: 1577-1585.
- [15] Rosso M N, Dubrana M P, Cimbolini N, et al. Application of RNA interference to root-knot nematode genes encoding esophageal gland proteins [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2005, 18: 615-620.
- [16] Gheysen G, Vanholme B. RNAi from plants to nematodes [J]. Trends in Biotechnology, 2007, 25: 89-92.
- [17] Huang G Z, 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 [J]. PNAS, 2006, 103: 14302-14306.
- [18] Yadav B C, Veluthambi K, Subramaniam K. Host-generated double stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection [J]. Molecular & Biochemical Parasitology, 2006, 148: 219-222.
- [19] Steeves R M, Todd T C, Essig J S, et al. Transgenic soybeans expressing siRNAs specific to a major sperm protein gene suppress *Heterodera glycines* reproduction [J]. Functional Plant Biology, 2006, 33: 991-999.
- [20] Roberts T M, Steward M. Nematode sperm locomotion [J]. Current Opinion in Cell Biology, 1995, 7: 13-17.
- [21] Bottino D, Mogilner A, Roberts T, et al. How nematode sperm crawl [J]. Journal of Cell Science, 2002, 115: 367-384.
- [22] Fairbairn D J, Cavallaro A S, Bernard M, et al. Host-delivered RNAi: an effective strategy to silence genes in plant parasitic nematodes [J]. Planta, 2007, 226(6): 1525-1533.
- [23] Jacobs JJ, Sanders M, Bots M, et al. Sequences throughout the basic β -1,3-glucanase mRNA coding region are targets for homology-dependent post-transcriptional silencing [J]. Plant J, 1999, 20: 143-152.
- [24] Kerschen A, Napoli C A, Jorgensen R A, et al. Effectiveness of RNA interference in transgenic plants [J]. FEBS Lett, 2004, 566: 223-228.
- [25] Hussey R S and Mims CW. Ultrastructure of feeding tubes formed in giant cells induced in plants by the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* [J]. Protoplasma, 1991, 162: 99-107.
- [26] Bockenhoff A, Crundler F MW. Studies on nutrient uptake by the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* by in situ microinjection of fluorescent probes into the feeding structures in *Arabidopsis thaliana* [J]. Parasitology, 1994, 109: 249-254.
- [27] Urwin P E, Lilley C J, McPherson M J, et al. Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin [J]. Plant Journal, 1997, 12: 455-461.
- [28] Bakhtia M, Charlton W L, Urwin P E, et al. RNA interference and plant parasitic nematodes [J]. Trends Plant Science, 2005, 10: 362-367.
- [29] Pinto Y M, Kok R A, Bandcombe D C. Resistance to rice yellow mottle virus (RYMV) in cultivated African rice varieties containing RYMV transgenes [J]. Nat. Biotechnol., 1999, 17(7): 702-707.
- [30] Wang M B, Abbott D C, Waterhouse P M. A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus [J]. Mol. Plant Pathol, 2000, 1(6): 347-356.
- [31] Tenllado F, Diaz-Ruiz J R. Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection [J]. J Virol, 2001, 75(24): 12288-12297.
- [32] Tenllado F, Llave C, Diaz-Ruiz J R. RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants [J]. Virus Research, 2004, 102: 85-96.
- [33] Kalantidis K, Psaradakis S, Tabler, M, et al. The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus [J]. MPMI, 2002, 15(8): 826-833.
- [34] Takahashi S, Komatsu K, Kagiwada S, et al. The efficiency of interference of Potato virus X infection depends on the target gene [J]. Virus Research, 2006, 116: 214-217.