

VIGS 技术在昆虫基因功能研究中的应用*

王鑫仪** 靖湘峰***

(西北农林科技大学, 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 杨凌 712100)

摘 要 RNAi 作为一种基因沉默的分子生物学技术, 广泛应用于生物基因功能研究。在昆虫 RNAi 研究中, 病毒诱导的基因沉默 (Virus-induced gene silencing, VIGS) 技术是一种将 dsRNA 导入昆虫体内的独特策略。目前, 这种方法在半翅目和鳞翅目昆虫的研究中有诸多报道。通过携带靶标昆虫基因片段的重组病毒载体侵染寄主植物, 病毒在复制过程中形成 dsRNA。实验昆虫取食被侵染的寄主植物后会摄入大量的 dsRNA, 从而达到 dsRNA 导入的目的。与其它 dsRNA 导入方法相比, VIGS 技术具有高效、高通量、昆虫接受度高等优势。本文综合分析了 VIGS 技术的作用机理、应用研究、影响效率的因素及其优缺点, 将来应围绕这些问题进一步深化该技术在昆虫学研究中的应用。

关键词 VIGS; RNAi; 昆虫; 基因功能

The application of virus-induced gene silencing (VIGS) to research on insect gene function

WANG Xin-Yi** JING Xiang-Feng***

(State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract RNA interference has been extensively applied to research on insect gene function. Successful application of this technology requires accurate delivery of interfering agents, such as double-stranded RNA (dsRNA), or short interfering RNA (siRNA), to target organisms. This paper focuses on a unique strategy for delivering dsRNA into plant-feeding insects, namely VIGS (virus-induced gene silencing) technology. Most studies that have used VIGS to investigate gene function have focused on hemipteran and lepidopteran pests. A gene fragment targeting a plant-feeding insect is inserted into the genome of a recombinant virus, which then infects the host plant. Double-stranded RNA can be produced in the host plant through virus replication. When an insect feeds on the host plant, dsRNA is ingested to inhibit the expression of the target gene. Due to the complex interactions among viruses, plants, and insects, several factors can affect the efficiency of this system. In comparison to other dsRNA introducing methods, VIGS technology is less labor-intensive and allows the large-scale screening of genes. Moreover, it has proven highly efficient in suppressing some lepidopteran insect pests that are reported to be refractory to RNAi. The application of VIGS technology to insect RNAi has, however, some limitations. This paper provides a reference for the further development and application of VIGS technology in insect research and pest control, and provides an overview of the mechanisms, current applications, and factors affecting suppression efficiency. The advantages and problems associated with this technology are also discussed so that these can be addressed in future research.

Key words VIGS; RNAi; insect; gene function

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是真核生物中一种保守的基因调控和病毒防御机制, 是通过双链 RNA (Double-stranded RNA,

dsRNA) 特异性地诱导同源 mRNA 高效降解的现象, 是一种重要的反向遗传学工具, 广泛应用于基因功能的研究 (Swevers *et al.*, 2018)。在昆

*资助项目 Supported projects: 国家重点研发计划 (2017YFD0200400)

**第一作者 First author, E-mail: wxyy0918@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: jxf_zb@sina.cn

收稿日期 Received: 2020-09-15; 接受日期 Accepted: 2021-02-01

虫学领域中 RNAi 技术也广泛应用, 已经成为快速分析昆虫基因功能并衡量其防治应用潜力的重要工具 (Koch and Kogel, 2014)。昆虫 RNAi 导入方法多样, 其中大多数是将体外合成的 dsRNA 导入受体昆虫中而产生干扰效应 (Yu *et al.*, 2013; Zhu and Palli, 2020)。饲喂法和注射法是两种最常用的导入手段; 相较于注射法, 饲喂法操作简便且不会对昆虫产生机械损伤 (田宏刚等, 2019)。而对于植食性昆虫, 饲喂表达靶标基因 dsRNA 的转基因植物的方法最易让受试昆虫接受, 能够模拟昆虫的自然取食状态; 并且在植物体内表达的 dsRNA 更稳定、不易降解, 昆虫可以持续大量地摄取 dsRNA (Zhang *et al.*, 2015)。因此, 开发表达 dsRNA 的转基因植物是一种极具应用价值的害虫防控策略 (Baum and Roberts, 2014)。然而, 将外源 dsRNA 导入植物体内并培育成转基因植物的过程, 难度大、周期长且成本高 (Baum *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2007)。

病毒诱导的基因沉默 (Virus-induced gene silencing, VIGS) 是植物抵御病毒侵染的一种现象, 其机制是植物调用其核糖核酸酶复合体 (RNase complex) 并通过互补的小干扰 RNA (Short interfering RNA, siRNA) 引导去定向降解病毒基因组 (Ratcliff *et al.*, 1997)。基于此机制, 植物学家们建立了快速验证植物基因功能的系统, 即将植物基因的部分片段插入病毒载体, 利用重组病毒侵染植物后复制产生 dsRNA 来抑制植物该基因的表达, 从而确定该基因的功能 (Becker and Lange, 2010)。在此基础上, 昆虫学家们也开始使用该方法分析植食性昆虫基因的功能。这为害虫靶标基因和作物抗虫品种的筛选和评估提供了一种重要的方法和工具。本文对近年来 VIGS 技术在昆虫基因功能研究方面的应用进行系统分析, 介绍 VIGS 技术介导的昆虫 RNAi 的作用机理; 并从 VIGS 系统的选择、靶标基因片段的设计、VIGS 载体的接种方法、环境条件、受体昆虫五个方面系统分析 VIGS 技术在昆虫基因功能研究中的应用情况。最后, 通过与转基因植物介导的昆虫 RNAi 法进行比较, 分析 VIGS 技术的优缺点。

1 VIGS 技术介导的昆虫 RNAi 的作用机理

VIGS 技术介导的昆虫 RNAi 属于寄主诱导基因沉默 (Host induced gene silencing, HIGS) 的范畴, HIGS 一般指通过寄主介导的 RNAi 技术沉默有害生物的关键基因或其寄主的相关基因, 从而有效降低有害生物危害性的技术方法 (Koch and Kogel, 2014; Ghag, 2017)。VIGS 技术介导的昆虫 RNAi 是植物 VIGS 技术和昆虫 RNAi 技术的结合与延伸, 其作用机理主要包括两个过程: 首先是携带靶标基因的病毒载体侵染植物, 通过病毒的自我复制而在植物中表达昆虫靶标基因的 dsRNA/siRNA; 然后昆虫通过取食植物而摄入这些 dsRNA/siRNA 从而抑制昆虫基因的表达。

1.1 植物中沉默效应因子 dsRNA/siRNA 的产生与消退

当重组病毒侵染植物后, 病毒利用植物细胞中的代谢工具进行自我复制形成 dsRNA, 然后被植物自身的 RNase III 家族特异性核酸内切酶 Dicer-like (DCL) 识别并切割成 21-24 nt 的 siRNA (Donaire *et al.*, 2008; Liave, 2010)。siRNA 可通过胞间连丝进行相邻细胞间的短距离扩散, 也可通过韧皮部进行长达 20 cm 的远距离运输 (Jose and Hunter, 2007)。在病毒侵染后期, 随着 dsRNA 的积累并不断被切割, 产生的 siRNA 引导植物的核糖核酸酶复合体定向降解病毒基因组, 从而大幅度地降低病毒数量 (Ratcliff *et al.*, 1997)。因此, 与转基因植物稳定表达 dsRNA 不同, VIGS 技术利用植物对病毒产生的 RNAi 防御反应, 只会有一段时期内产生靶标基因 dsRNA 及其被切割产生的 siRNA, 这也是“瞬时表达”的由来。一般情况下, 病毒侵染后 10 d 左右, 就可以检测到 dsRNA/siRNA 的表达, 时间可持续 1-2 个月 (Lu *et al.*, 2003)。

1.2 沉默效应因子 dsRNA/siRNA 抑制昆虫靶标基因的表达

昆虫通过取食摄入 dsRNA/siRNA, 首先要

进入肠道细胞 (Enterocytes)。研究表明网格蛋白 (Clathrin) 介导的内吞作用是细胞摄取 dsRNA 的主要机制 (Xiao *et al.*, 2015)。此外, 因为跨膜通道蛋白 (Systemic RNA interference defective, SID) 介导的 dsRNA 摄取机制在秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 中起重要作用 (McEwan *et al.*, 2012), 并且昆虫具有相应的同源基因, 所以 SID 可能在昆虫中也有相似的功能。但是有研究发现, 蝗虫等昆虫的 SID 同源基因表达被沉默后, RNAi 效应并不受影响 (Tomoyasu *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2012)。因此, SID 在昆虫摄入 dsRNA 中的作用还需进一步明确。无论如何, dsRNA/siRNA 可以进入昆虫细胞以发挥干扰作用。dsRNA/siRNA 进入肠道细胞后可引起肠道靶基因的沉默; 但如果靶标基因主要在其它组织表达, 沉默信号需要通过细胞或组织间传导到达相应部位引起干扰作用, 即系统性 RNAi (Systemic RNAi) (Huvenne and Smagghe, 2010)。研究报道线虫、植物中的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA dependent RNA polymerase, RdRP) 在沉默信号的传导过程中起重要作用 (Zong *et al.*, 2009)。但是在昆虫中并未发现 RdRP 同源基因 (Zong *et al.*, 2009)。因此昆虫可能通过不同机制进行沉默信号的传导。例如, 有研究发现黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 被病毒感染后, 针对病毒的 dsRNA 可通过纳米管样结构在相邻细胞间运输 (Karlikow *et al.*, 2016)。此外, 果蝇中由血细胞分泌并参与免疫启动的外泌体样囊泡 (Exosome-like vesicles) 也可以运输 siRNA, 从而产生系统性 RNAi (Tassetto *et al.*, 2017)。然而, 其它昆虫是否具有相应的机制仍不清楚。

总而言之, 昆虫摄入的 dsRNA 进入细胞后, 会被 RNase III 类的 DCL-2 酶切割成 21-24 nt 的 siRNA, 并形成沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC)。siRNA 引导 RISC 与其同源 mRNA 互补结合, 从而对靶标基因 mRNA 进行特异性的切割降解, 降低靶标基因的表达水平 (Kim *et al.*, 2009; Joga *et al.*, 2016; Zhu and Palli, 2020)。

2 VIGS 技术介导的 RNAi 在昆虫学领域中的应用

目前, VIGS 技术成功应用到多种植食性昆虫的基因功能研究中 (表 1)。其中, 以蚜虫、木虱、粉虱为代表的半翅目昆虫的研究较多。这些昆虫是重要的农业害虫, 但是由于其取食行为方式, 一般不易通过人工饲料的方式导入 dsRNA。即使有的昆虫有人工饲料, 这些人工饲料也很难准确模拟昆虫直接取食其寄主植物的状态。例如, 相较于取食植物, 蚜虫取食人工饲料时的食量会大幅减少, 这是由于蚜虫取食的韧皮部汁液具有正压可加速食物进入蚜虫的肠道系统 (Dinant *et al.*, 2010)。同时, 这些研究一般选取具有防治意义的靶标基因, 为开发抗虫转基因植物提供了重要依据。肌动蛋白 (Actin) 是细胞的一种重要骨架蛋白, 而 V 型泵 (V-ATPase) 则广泛参与细胞内物质运输过程, 是生物体内重要的功能蛋白。研究发现, VIGS 技术可将番茄木虱 *Bactericera cockerelli* 和柑橘粉蚧 *Planococcus citri* 的 actin 和 V-ATPase 基因的转录水平降低 60% 左右; 并且害虫死亡率显著上升, 生殖力显著降低 (Khan *et al.*, 2013; Wuriyanghan and Falk, 2013)。蚜虫、木虱、粉虱等刺吸式害虫以取食韧皮部汁液为主。韧皮部汁液糖含量高, 渗透压大, 这些昆虫需将多余的糖份排出体外, 否则会引起昆虫失水死亡 (Jing *et al.*, 2016)。水通道蛋白 (Aquaporin)、蔗糖酶 (Sucrase) 和糖转运蛋白 (Sugar transporter) 与蚜虫体内渗透压调节以及水分平衡密切相关 (Price *et al.*, 2007; Shakesby *et al.*, 2009)。以桃蚜 *Myzus persicae* 为研究对象, 通过重组烟草脆裂病毒 (Tobacco rattle virus, TRV) 侵染的本氏烟草 *Nicotiana benthamiana* 和番茄 *Lycopersicon esculentum* 表达的 dsRNA 能够有效抑制水通道蛋白、蔗糖酶以及糖转运蛋白基因的转录表达, 导致蚜虫血淋巴的渗透压提高、体重减轻和繁殖力下降 (Tzin *et al.*, 2015)。

此外, VIGS 技术在鳞翅目昆虫中的研究也有报道。研究人员利用携带细胞色素 P450 基因

续表 1 (Table 1 continued)

昆虫种类		病毒载体		病毒载体接种		靶标基因		主要结果	参考文献
目	种	类型	名称	宿主植物	接种方法	名称	长度 (bp)	Major findings	References
Order	Species	Type	Name	Host plants	Infection method	Name	Length	Orientation	
半翅目 Hemiptera	烟粉虱 <i>Bemisia tabaci</i>	RNA 病毒	烟草脆裂病病毒 TRV	番茄 <i>S. lycopersicum</i>	农杆菌注射法 Agro-infiltrated	<i>CypB</i> , <i>hsp70</i>	282/315	正向 Sense orientation	基因表达下降, 翅畸形, 死亡, Kanakala 产卵量减少, 传播番茄黄化病 <i>et al.</i> , 2019 叶病毒 TYLCV 能力下降 Reduced gene expression, wing malformation, increased mortality, reduced reproduction, decreased ability to transmit TYLCV
	亚洲柑橘木虱 <i>Diaphorina citri</i>	RNA 病毒	柑橘病毒	本氏烟草 <i>N. benthamiana</i> ; 柑橘 <i>Citrus</i>	农杆菌注射法; 伤口涂沫接种 Agro-infiltrated; Bark-flap inoculation	<i>Awd</i>	462	正向 Sense orientation	基因表达下降, 翅膀畸形和死亡 Hajeri <i>et al.</i> , 2014 死亡 Reduced gene expression, wing malformation and increased mortality
	柑橘粉蚧 <i>Planococcus citri</i>	RNA 病毒	烟草花叶病毒 TMV	本氏烟草 <i>N. benthamiana</i>	农杆菌注射法 Agro-infiltrated	<i>Actin</i> , <i>CHS1</i> , <i>V-ATPase</i>	168/290/ 332	正向, 反向 Sense and antisense orientation	基因表达下降, 生殖力降低, Khan <i>et al.</i> , 2013 死亡 Reduced gene expression, reduced fecundity, and increased mortality
绵粉蚧 <i>Phenacoccus solenops</i>	绵粉蚧	RNA 病毒	马铃薯 X 病毒 PVX	本氏烟草 <i>N. benthamiana</i>	农杆菌注射法 Agro-infiltrated	<i>CHS1</i>	419	正向 Sense orientation	基因表达下降, 畸形, 死亡 Khan <i>et al.</i> , 2015 Reduced gene expression, body malformation, and increased mortality
	绵粉蚧	RNA 病毒	马铃薯 X 病毒 PVX	普通烟草 <i>N. tabacum</i>	农杆菌注射法 Agro-infiltrated	<i>Bursicon</i> , <i>V-ATPase</i>	170/580	正向 Sense orientation	基因表达下降, 畸形, 死亡 Khan <i>et al.</i> , 2018 Reduced gene expression, body malformation, and increased mortality

- 表示参考文献中未给出对应的数据。
- indicates that the data are not found in references.

片段的重组 TRV 载体侵染渐狭叶烟草 *Nicotiana attenuata* 后饲喂烟草天蛾 *Manduca sexta*, 发现烟草天蛾靶标基因的表达水平显著降低 (Kumar *et al.*, 2012)。将 2 个几丁质酶基因片段与 TRV 载体进行重组侵染本氏烟草 *N. benthamiana* 表达 dsRNA; 粘虫 *Mythimna separata* 取食后 2 个靶标基因的表达水平分别下调了 76% 和 45%, 同时粘虫体重显著下降 (Bao *et al.*, 2016)。通常 RNA 干扰对鳞翅目昆虫幼虫效果不明显 (Cooper *et al.*, 2019; 田宏刚等, 2019)。这两项研究的成功可能归功于病毒载体在寄主植物体内的大量复制而导致昆虫能够持续不断地摄入大量的 dsRNA/siRNA。因此, VIGS 技术在沉默鳞翅目昆虫基因研究方面也有很好的适用性。

从上述研究结果来看, 植食性昆虫取食重组病毒载体侵染的植物后, 其靶标基因的表达量会显著减少, 其生长发育和繁殖力均有显著降低甚至死亡。因此, VIGS 技术为植食性昆虫靶标基因的功能研究提供了重要工具, 并且可以快速评价以这些基因为靶标进行害虫防治的有效性。目前 VIGS 技术介导的昆虫 RNAi 研究仍相对较少, 对于该方法还需要更多深入的探索。

3 VIGS 技术介导昆虫 RNAi 效率的影响因素

利用 VIGS 技术介导昆虫 RNAi 的研究涉及病毒、植物、昆虫三个主体, 而植物是连接 dsRNA (重组病毒载体) 与受体昆虫的桥梁。一般情况下, VIGS 技术介导的昆虫 RNAi 必然以特定的昆虫为研究对象, 因此可供选择的寄主植物也有确定的范围。在此基础上, 可根据以往研究获得的有关植物与病毒 VIGS 系统的稳定性和可靠性信息, 筛选出合适的病毒-寄主植物-昆虫体系。这里我们从 VIGS 系统的选择、靶标基因片段的设计、VIGS 载体的接种方法、环境温度、受体昆虫五个方面综合分析 VIGS 技术影响昆虫 RNAi 效率的潜在因素。

3.1 VIGS 系统的选择

目前已报道的病毒载体主要包括 RNA 病毒

载体、DNA 病毒载体和卫星病毒载体三类。表 1 列出了在昆虫中取得成功的 VIGS 系统。其中, RNA 病毒载体应用最早且成熟, 如 TMV、TRV、PVX 等; 这些改造过的病毒载体能够成功侵染烟草、番茄等一些茄科植物。值得注意的是, 使用不同类型病毒载体的 VIGS 对昆虫的表达抑制效果会有所不同。例如, 使用重组 TMV、TRV 和 PVX 3 种病毒载体分别侵染烟草并表达针对番茄木虱的 ATPase 基因的 dsRNA, 发现番茄木虱仅在取食感染 TMV 的烟草叶片后靶标基因 mRNA 水平下降 (Wuriyanghan and Falk, 2013)。此外, 通过改造新的病毒载体也可以实现对某些特殊植物-昆虫体系的研究。例如, 亚洲柑橘木虱 *Diaphorina citri* 是世界性重要害虫, 除本身取食造成的危害外, 还可传播毁灭性细菌性病害柑橘黄龙病 *Liberbacter asiaticum jagoueix*, 严重影响全世界柑桔产量。Hajeri 等 (2014) 改造了一种常见的柑桔病毒 CTV 以表达针对亚洲柑橘木虱 *Diaphorina citri* 翅膀发育相关基因 (Abnormal wing disc, Awd) 的 dsRNA。取食被重组病毒感染的柑桔后, 木虱 Awd 基因表达被明显抑制。该系统的研发成功, 为亚洲柑橘木虱的研究提供重要的工具, 也为其它木本植物害虫的研究提供了重要的借鉴。

3.2 靶标基因片段的设计

VIGS 载体中插入的靶标基因片段对昆虫 RNAi 效率的影响主要包括序列的特异性、长度和方向三个方面。首先, 靶标基因序列特异位点区域的选择对 RNAi 效率影响较大 (Gong *et al.*, 2013)。VIGS 技术介导的昆虫 RNAi 需要考虑表达的 siRNA 能否与靶标基因特异的位点结合并避免脱靶效应。其次, 从目前的 VIGS 技术介导的昆虫 RNAi 研究来看, 靶标基因片段的长度范围设计在 150-500 bp 内都能实现靶标基因的有效沉默, 同时这个长度范围也考虑了病毒基因组的容纳能力 (表 1)。一般情况下, 病毒复制产生的外源基因 dsRNA 会被植物自身 RNAi 系统加工成 siRNA, 因此, 昆虫取食获得的主要是小片段 siRNA (Kumar *et al.*, 2012)。但是有研究

表明,长片段 dsRNA 相较于 siRNA 的沉默效率更高。例如,沉默烟草 *DCL* 基因会抑制植物将 dsRNA 切割为 siRNA,而这会显著提高烟草天蛾靶标基因的沉默效率 (Kumar *et al.*, 2012)。还有研究发现,在叶绿体 *DCL* 酶缺失的马铃薯 *Solanum tuberosum* 中表达以肌动蛋白基因为靶标的 dsRNA,并饲喂马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*,其死亡率显著提高 (Zhang *et al.*, 2015)。值得注意的是,病毒载体侵染诱导表达产生的 dsRNA 并不限制在叶绿体中。因此,若能抑制植物其它部位的 *DCL* 酶的表达或活性,有可能会进一步提高 dsRNA 在植物体内的相对含量和对昆虫基因的干扰效率。最后,载体中所插入靶标基因片段的方向可分为反向互补、正向插入和反向插入 3 种。反向互补插入是将靶基因片段以反向互补的形式插入载体中,转录时形成发卡结构 (Hairpin),常用于转基因植物表达 dsRNA 而构建的载体 (Mamta *et al.*, 2016; 罗晓丽等, 2018; 刘扬等, 2020)。这种反向互补插入的方式在 VIGS 技术应用中尚未报道;而靶标基因片段的正向插入和反向插入均在 VIGS 技术中有报道,但是基因沉默效果不尽相同。例如,有研究将柑橘粉蚧 *V-ATPase* 和 *CHS1* 基因片段分别以正、反两个方向插入 TMV 载体中并侵染烟草植株。柑橘粉蚧在取食正向插入的叶片后, *CHS1* 基因 mRNA 水平下降 10%;而取食反向插入的叶片后, *CHS1* 基因 mRNA 下降水平可达到 50%,同时死亡数量显著高于前者。相反, *V-ATPase* 基因的插入方向对昆虫 mRNA 表达水平和死亡数量都没有显著影响 (Khan *et al.*, 2013)。

3.3 VIGS 载体的接种方法

构建好重组病毒载体后,需要将载体接种到寄主植物上。接种方法对植物能否产生 dsRNA 至关重要。目前,病毒载体接种方法主要有摩擦接种、微粒轰击及农杆菌渗入接种 3 种。摩擦接种是用 RNA 病毒的体外转录产物或其侵染易感植株叶片汁液的提取物,直接将病毒基因组擦抹在受损叶片上 (Wuriyanghan and Falk, 2013;

Hajeri *et al.*, 2014)。这种方法程序繁琐,费时费力,并且不同植株间病毒接种量可能会差异较大。微粒轰击 (也称生物弹) 是通过基因直接转移的物理方法将 DNA 病毒送入植物细胞中 (Kjemtrup *et al.*, 1998)。其缺点是靶标基因导入成功率较低,随机性太大;同时所需实验仪器昂贵,实验成本较高。与前两种方法相比,农杆菌介导的瞬时表达法应用最为广泛,不但成本低廉且操作简便,而且接种后病毒侵染效率高 (Krennek *et al.*, 2015)。其原理是将携带靶标基因的病毒载体转化到根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 中,然后让农杆菌与植株叶片细胞接触从而介导病毒进入细胞,携带靶标基因的病毒载体不断在植物体内复制、转录和传播从而达到在植物中表达大量 dsRNA 的目的 (Kapila *et al.*, 1997)。影响农杆菌侵染效率的因素较多,主要包括接种时选用的农杆菌菌株、接种浓度以及植物的生长阶段和接种组织等因素。此外,农杆菌接种的方式也在不断改进优化,发展出了诸如叶背注射、根吸收法、真空浸透等接种方式 (张召军等, 2014; 刘鹏等, 2015; 钟巧芳等, 2019)。在昆虫研究中采用的 VIGS 载体接种方法以农杆菌注射为主,少数采用了摩擦接种的方法。这两种方法都成功地将携带外源靶标基因的病毒载体导入到了寄主植物中。

3.4 环境温度

研究发现当重组病毒载体侵染植物后,温度是影响 VIGS 沉默效率的关键因素。对于常用的 TRV 载体而言,最适温度随植物种类而异。在番茄 *S. lycopersicum* 上, 21 °C 及以下能够产生良好的沉默表型;在本氏烟 *N. benthamiana* 上则以 25 °C 最佳;而在胡杨 *Populus euphratica* 上 28 °C 时沉默效率最高 (周婷, 2010; Shen *et al.*, 2015)。此外,在 18 °C 的低温培养条件下,雀麦草花叶病毒 (Brome mosaic virus, BMV) 载体可以实现对高粱基因的有效沉默 (Singh *et al.*, 2018)。同时,这些温度多在昆虫生长发育的适宜范围内。有关湿度、光照等其它环境因素对病毒侵染以及沉默效果的报道很少;一般情况下,只要满

足寄主植物正常生长即可。因此,在利用 VIGS 技术进行昆虫 RNAi 的实验时,关键的环境条件在于温度。确定最适宜的温度,才能获得高效的瞬时表达 dsRNA 的病毒-植物体系以用于昆虫研究。

3.5 受体昆虫的影响

RNAi 在不同昆虫物种甚至是同物种不同龄期间的效率都会有不同 (Rangasamy and Siegfried, 2012; Li *et al.*, 2013; Velez and Fishilevich, 2018)。产生差异的最根本原因是 RNAi 机制的种间差异化。这包括 dsRNA 降解、细胞摄取、胞间和胞内转运、dsRNA 向 siRNA 的转化以及 RNA 诱导的沉默复合物的形成等各个方面 (Joga *et al.*, 2016; Cooper *et al.*, 2019; 田宏刚等, 2019; Zhu and Palli, 2020)。这方面的研究已有多个相关综述进行了系统分析,在此不再赘述。此外,从生态学的角度来看,植食性昆虫的取食行为也可能影响对 dsRNA 的摄入,例如,与成虫相比,番茄木虱和柑橘粉蚧幼虫对 VIGS 更敏感 (Khan *et al.*, 2013; Wuriyangan and Falk, 2013)。这可能是由于幼虫取食量更大,摄取的 dsRNA 的剂量更高而导致的。总而言之,深入研究不同昆虫 RNAi 作用的详细机制,并结合昆虫的生理与行为机制,找到影响昆虫 RNAi 效率的关键因子,是提高 VIGS 干扰效率的重要途径。

4 VIGS 技术介导的昆虫 RNAi 的优缺点

自有研究报道在玉米 *Zea mays*、棉花 *Gossypium hirsutum* 和马铃薯 *S. tuberosum* 中表达相关 dsRNA 能够有效防治玉米根甲虫 *Diabrotica virgifera virgifera*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 和马铃薯甲虫以来 (Baum *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2015), 应用 RNAi 方法进行害虫绿色防控成为了一个重要研究领域。而 VIGS 技术为大规模快速筛选靶标基因,培育相应的转基因抗虫植物提供了重要参考依据。下面对该方法的优缺点进行分析总结。

4.1 VIGS 技术介导的昆虫 RNAi 的优点

与传统的构建转基因植物方法相比,采用病毒诱导寄主植物瞬时表达 dsRNA 的方法具有独特的优势,主要表现在:第一,避免了繁琐的植物繁育过程,操作简易。一般从构建重组载体到侵染植物诱导表达 dsRNA 仅需几个星期,节约时间 (Hajeri *et al.*, 2014)。正是基于以上特点,该技术常用于靶标基因的高通量筛选 (Kumar *et al.*, 2012)。第二,无需构建转基因植株,有利于在转基因实施困难的植物上进行 RNAi 研究 (刘美等, 2018)。第三,表达效率高。利用病毒复制、传播迅速以及少量的 dsRNA 就足以通过植物沉默信号的放大机制引发高效的基因沉默的特点 (Lu *et al.*, 2003), 可对半翅目、鳞翅目等 RNAi 不敏感昆虫进行分析。第四,相对安全,重组病毒载体并未整合到植物基因组中,不产生可遗传后代 (Lu *et al.*, 2003)。

4.2 VIGS 技术介导的昆虫 RNAi 的缺点

与其它昆虫 RNAi 研究方法相比,利用 VIGS 技术也存在一些不足,主要表现在:第一, VIGS 病毒载体的寄主范围有限。多数 VIGS 系统都基于模式植物建立,与昆虫对应的寄主植物可能会缺少成熟的 VIGS 系统,从而限制这方面的研究。若是昆虫的寄主植物没有合适的病毒载体侵染,则无法通过 VIGS 实现在植物中表达昆虫靶标基因的 dsRNA。如在大麦、玉米等主要经济作物以及瓜果、蔬菜等园艺作物上的 VIGS 载体还相对较少 (刘美等, 2018)。第二,许多病毒可以合成沉默抑制蛋白 (Silencing suppressor) 来逃避宿主的抗病毒 RNA 沉默,从而导致沉默效率不高。目前研究发现,病毒可以通过多种抑制蛋白阻断植物的抗病毒 RNA 沉默的关键步骤。例如,在起始阶段,通过与 dsRNA 结合以阻碍 siRNA 的产生;在传播阶段,通过与 siRNA 结合以阻碍 siRNA 在细胞间的移动与扩增;在沉默效应阶段,通过与 Argonaute 蛋白结合以影响沉默复合物的形成和靶向 (Csorba *et al.*, 2015)。这些病毒沉默抑制机制均会影响 VIGS 对昆虫的干扰效率。第三,使用 VIGS 技术研究昆虫基因

的功能受时间限制影响明显。一般 VIGS 有效沉默期约 30-60 d, 之后将出现基因沉默衰减和表型恢复等现象。不过有研究表明, 采用低温和低湿的方法可适当延长基因沉默的时间 (Fu *et al.*, 2006)。第三, VIGS 技术存在 dsRNA 表达不均一的现象, 即 dsRNA 可能在植株某些部位表达高, 而在另外一些部位表达低甚至不表达。有时植株个体间也会出现 dsRNA 表达差异的情况 (Dalakouras *et al.*, 2018), 这会影响 VIGS 实验的重复性。目前, 主要通过改善环境条件以利于病毒扩散及沉默信号传播和设置沉默后有可见表型“标记”的沉默区域的阳性对照两个方面来提高实验重复性。第四, 利用 VIGS 技术在植物上表达的 dsRNA/siRNA 难以准确定量, 从而无法衡量 dsRNA/siRNA 的剂量效应。第五, 病毒载体的使用仍存在一定的安全性问题。昆虫取食植物, 会同时获取病毒, 因而实验昆虫和植物可能会成为病毒的传播媒介。例如, 非洲木薯花叶病毒 (African cassava mosaic virus, ACMV)、中国番茄黄化曲叶病毒 (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) 常作为 VIGS 载体病毒, 这些病毒可被烟粉虱传播 (Chikoti *et al.*, 2013; 李英梅等, 2019); 同样, 黄瓜花叶病毒 (Cucumber mosaic virus, CMV) 能通过桃蚜传播 (梁彦, 2017)。因此进行 VIGS 技术介导的昆虫 RNAi 研究时, 病毒载体应尽量选用无虫传能力的弱毒株, 或对病毒载体进行改造使其不被介体传播 (梁彦, 2017; 刘美, 2019)。

5 小结与展望

本文从作用机理、应用情况、干扰效率的影响因素以及优缺点方面介绍了 VIGS 技术在昆虫基因功能研究的现状。VIGS 技术可以在植食性昆虫与植物相互作用期间对昆虫的基因功能进行“实时”分析, 为表达 dsRNA 的转基因抗虫植物提供一种筛选与评估的策略。因此, 该技术在开发创新型的害虫防控手段方面具有广阔的应用前景。然而, 对于病毒与宿主的相互作用机制、沉默效应因子在植物和昆虫体内的传播和扩增机制的研究并不完善。深入认识这些机制和规

律, 提高沉默效率, 建立高效的 VIGS 体系是今后研究的重点。此外, 进一步开发新的 VIGS 载体或改进原有的载体, 改进载体接种方法以及植物的培育条件, 都会有助于 VIGS 技术在昆虫基因功能研究中的应用。随着研究和技术的不断发展, VIGS 技术将会更加广泛地应用到昆虫基因功能以及害虫防治研究中, 成为昆虫学研究的重要手段。

致谢: 本论文在西北农林科技大学应用昆虫学重点实验室完成, 修改过程中得到田宏刚老师的帮助, 特此致谢!

参考文献 (References)

- Bao WH, Cao BD, Zhang YA, Wuriyanghan H, 2016. Silencing of *Mythimna separata* chitinase genes via oral delivery of in planta-expressed RNAi effectors from a recombinant plant virus. *Biotechnology Letters*, 38(11): 1961–1966.
- Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, Johnson S, Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M, Vaughn T, Roberts J, 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*, 25(11): 1322–1326.
- Baum JA, Roberts JK, 2014. Progress towards RNAi-mediated insect pest management. *Advances in Insect Physiology*, 47(5): 249–295.
- Becker A, Lange M, 2010. VIGS-genomics goes functional. *Trends in Plant Science*, 15(1): 1–4.
- Csorba T, Kontra L, Burgyán J, 2015. Viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology*, 479/480: 85–103.
- Chikoti PC, Ndunguru J, Melis R, Tairo F, Shanahan P, Sseruwagi P, 2013. Cassava mosaic disease and associated viruses in Zambia: Occurrence and distribution. *International Journal of Pest Management*, 59(1): 63–72.
- Cooper AM, Silver K, Zhang JZ, Park Y, Zhu KY, 2019. Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. *Pest Management Science*, 75(1): 18–28.
- Dalakouras A, Jarausch W, Buchholz G, Bassler A, Braun M, Manthey T, Krczal G, Wassenegger M, 2018. Delivery of hairpin RNAs and small RNAs into woody and herbaceous plants by trunk injection and petiole absorption. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1253.
- Dinant S, Bonnemain JL, Girousse C, Kehr J, 2010. Phloem sap intricacy and interplay with aphid feeding. *Comptes Rendus*

- Biologies*, 333(6/7): 504–515.
- Donaire L, Barajas D, Martinez-Garcia B, Martinez-Priego L, Pagan I, Llave C, 2008. Structural and genetic requirements for the biogenesis of tobacco rattle virus-derived small interfering RNAs. *Journal of Virology*, 82(11): 5167–5177.
- Fu DQ, Zhu BZ, Zhu HL, Zhang HX, Xie YH, Jiang WB, Zhao XD, Luo YB, 2006. Enhancement of virus-induced gene silencing in tomato by low temperature and low humidity. *Molecules and Cells*, 21(1): 153–160.
- Ghag S, 2017. Host induced gene silencing, an emerging science to engineer crop resistance against harmful plant pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 100(10): 242–254.
- Gong L, Chen Y, Hu Z, Hu MY, 2013. Testing insecticidal activity of novel chemically synthesized siRNA against *Plutella xylostella* under laboratory and field conditions. *PLoS ONE*, 8(5): e62990.
- Hajeri S, Killiny N, El-Mohtar C, Dawson WO, Gowda S, 2014. Citrus tristeza virus-based RNAi in citrus plants induces gene silencing in *Diaphorina citri*, a phloem-sap sucking insect vector of citrus greening disease (Huanglongbing). *Journal of Biotechnology*, 176(2): 42–49.
- Huvenne H, Smagghe G, 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. *Journal of Insect Physiology*, 56(3): 227–235.
- Jing XF, White TA, Luan J, Jiao C, Fei Z, Douglas AE, 2016. Evolutionary conservation of candidate osmoregulation genes in plant phloem sap-feeding insects. *Insect Molecular Biology*, 25(3): 251–258.
- Joga MR, Zotti MJ, Smagghe G, Christiaens O, 2016. RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: What we know so far. *Frontiers in Physiology*, 7: 553.
- Jose AM, Hunter CP, 2007. Transport of sequence-specific RNA interference information between cells. *Annual Review of Genetics*, 41: 305–330.
- Kanakala S, Kotsedalov S, Lebedev G, Ghanim M, 2019. Plant-mediated silencing of the whitefly *Bemisia tabaci* cyclophilin b and heat shock protein 70 impairs insect development and virus transmission. *Frontiers in Physiology*, 10: 557.
- Kapila J, Rycke RD, Montagu MV, Angenon GJPS, 1997. Erratum: An agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science*, 124(2): 101–108.
- Karlikow M, Goic B, Mongelli V, Salles A, Schmitt C, Bonne I, Zurzolo C, Saleh MC, 2016. *Drosophila* cells use nanotube-like structures to transfer dsRNA and RNAi machinery between cells. *Scientific Reports*, 6: 27085.
- Khan AM, Ashfaq M, Kiss Z, Khan AA, Mansoor S, Falk BW, 2013. Use of recombinant tobacco mosaic virus to achieve RNA interference in plants against the citrus mealybug, *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae). *PLoS ONE*, 8(9): e73657.
- Khan AM, Ashfaq M, Khan AA, Rasool A, Iqbal J, Mansoor S, 2015. Inoculation of *Nicotiana tabacum* with recombinant potato virus X induces RNA interference in the solenopsis mealybug, *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). *Biotechnology Letters*, 37(10): 2083–2090.
- Khan AM, Ashfaq M, Khan AA, Naseem MT, Mansoor S, 2018. Evaluation of potential RNA-interference-target genes to control cotton mealybug, *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Insect Science*, 25(5): 778–786.
- Kim VN, Han J, Siomi MC, 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(2): 126–139.
- Kjemtrup S, Sampson KS, Peele CG, Nguyen LV, Conkling MA, Thompson WF, Robertson D, 1998. Gene silencing from plant DNA carried by a geminivirus. *Plant Journal*, 14(1): 91–100.
- 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(7): 821–831.
- Krenek P, Samajova O, Luptovciak I, Daskocilova A, Kornis G, Samaj J, 2015. Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. *Biotechnology Advances*, 33(6): 1024–1042.
- Kumar P, Pandit SS, Baldwin IT, 2012. Tobacco rattle virus vector: A rapid and transient means of silencing *Manduca sexta* genes by plant mediated RNA interference. *PLoS ONE*, 7(2): e31347.
- Li J, Wang XP, Wang MQ, Ma WH, Hua HX, 2013. Advances in the use of the RNA interference technique in Hemiptera. *Insect Science*, 20(1): 31–39.
- Li YM, Bai Q, Wang ZP, Zhang WB, Liu C, Yang YW, 2019. Relationship between *Bemisia tabaci* and tomato yellow leaf curl disease. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 35(4): 102–107. [李英梅, 白青, 王周平, 张伟兵, 刘晨, 杨艺炜, 2019. 烟粉虱与番茄黄化曲叶病毒病发生关系研究. 中国农学通报, 35(4): 102–107.]
- Liang Y, 2017. The mechanism of *Myzus persicae* transmitting cucumber mosaic virus. Doctoral dissertation. Beijing: China Agricultural University. [梁彦, 2017. 桃蚜传播黄瓜花叶病毒机理的研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学.]
- Liu M, 2019. Construction of a VIGS vector based on cucumber green mottle mosaic virus. Master dissertation. Zhengzhou:

- Chinese Academy of Agricultural Sciences. [刘美, 2019. 基于黄瓜绿斑斑驳花叶病毒的 VIGS 载体构建. 硕士学位论文. 郑州: 中国农业科学院.]
- Liu M, Liu LM, Wu HJ, Gu QS, 2018. Research progress in VIGS technology and its application in cucurbitaceae crops. *Journal of Fruit Science*, 35(11): 1422–1429. [刘美, 刘莉铭, 吴会杰, 古勤生, 2018. VIGS 技术的研究进展及其在葫芦科作物中的应用. 果树学报, 35(11): 1422–1429.]
- Liu P, Wang SS, Yang GS, Zhang H, Han SF, Wang DM, 2015. Transient silencing of *HCP1* gene in wheat mediated by *Agrobacterium*. *Scientia Agricultura Sinica*, 48(20): 4188–4196. [刘鹏, 王帅帅, 杨高山, 张恒, 韩胜芳, 王冬梅, 2015. 农杆菌介导瞬时沉默小麦 *HCP1* 的研究. 中国农业科学, 48(20): 4188–4196.]
- Liu Y, Fang Y, JIN YL, Du AP, Yang GL, Guo L, Tan L, He KZ, Zhao H, 2020. Construction and transformation of *LmPDS* gene RNAi vector in *Lemna minor*. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 26(2): 280–286. [刘扬, 方扬, 靳艳玲, 杜安平, 杨贵利, 郭铃, 谭力, 何开泽, 赵海, 2020. 绿萍 *LmPDS* 基因 RNAi 载体的构建及遗传转化. 应用与环境生物学报, 26(2): 280–286.]
- Llave C, 2010. Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends in Plant Science*, 15(12): 701–707.
- Luo XL, Zhang AH, Xiao JL, Wang ZA, Chen XY, Wu JH, 2018. Transgenic cotton expressing double-stranded RNAs of *AgATPase Subunit E* gene increases resistance to aphids. *Cotton Science*, 30(5): 353–362. [罗晓丽, 张安红, 肖娟丽, 王志安, 陈晓英, 吴家和, 2018. 棉蚜腺苷三磷酸酶 E 亚基基因 RNAi 载体的构建及其抗蚜性分析. 棉花学报, 30(5): 353–362.]
- Lu R, Martin-Hernandez AM, Peart JR, Malcuit I, Baulcombe DC, 2003. Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*, 30(4): 296–303.
- Luo Y, Wang X, Yu D, Kang L, 2012. The SID-1 double-stranded RNA transporter is not required for systemic RNAi in the migratory locust. *RNA Biology*, 9(5): 663–671.
- Malik HJ, Raza A, Amin I, Scheffler JA, Scheffler BE, Brown JK, Mansoor S, 2016. RNAi-mediated mortality of the whitefly through transgenic expression of double-stranded RNA homologous to acetylcholinesterase and ecdysone receptor in tobacco plants. *Scientific Reports*, 6: 38469.
- Mamta Reddy KRK, Rajam MV, 2016. Targeting *chitinase* gene of *Helicoverpa armigera* by host-induced RNA interference confers insect resistance in tobacco and tomato. *Plant Molecular Biology*, 90(3): 281–292.
- Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY, 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology*, 25(11): 1307–1313.
- Mcewan DL, Weisman AS, Hunt CP, 2012. Uptake of extracellular double-stranded RNA by SID-2. *Molecular Cell*, 47(5): 746–754.
- Price DRG, Karley AJ, Ashford DA, Isaacs HV, Pownall ME, Wilkinson HS, Gatehouse JA, Douglas AE, 2007. Molecular characterisation of a candidategut sucrase in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(4): 307–317.
- Rangasamy M, Siegfried BD, 2012. Validation of RNA interference in western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae) adults. *Pest Management Science*, 68(4): 587–591.
- Ratcliff F, Harrison BD, Baulcombe DC, 1997. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science*, 276(5318): 1558–1560.
- Shakesby AJ, Wallace IS, Isaacs HV, Pritchard J, Roberts DM, Douglas AE, 2009. A water-specific aquaporin involved in aphid osmoregulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(1): 1–10.
- Shen ZD, Sun J, Yao J, Wang SJ, Ding MQ, Zhang HL, Qian ZY, Zhao N, Sa G, Zhao R, Shen X, Polle A, Chen SL, 2015. High rates of virus-induced gene silencing by tobacco rattle virus in *Populus*. *Tree Physiology*, 35(9): 1016–1029.
- Singh DK, Lee HK, Dweikat I, Mysore KS, 2018. An efficient and improved method for virus-induced gene silencing in sorghum. *Bmc Plant Biology*, 18(1): 123.
- Swevers L, Liu JS, Smagghe G, 2018. Defense mechanisms against viral infection in *Drosophila*: RNAi and Non-RNAi. *Viruses*, 10(5): 230.
- Tassetto M, Kunitomi M, Andino R, 2017. Circulating immune cells mediate a systemic RNAi-based adaptive antiviral response in *Drosophila*. *Cell*, 169(2): 314–325.
- Tian HG, Liu TX, Zhang WQ, 2019. Progress in RNAi technology, and prospects for its application, in entomological research in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 56(4): 605–616. [田宏刚, 刘同先, 张文庆, 2019. RNAi 技术在中国昆虫学研究中的发展、应用与展望. 应用昆虫学报, 56(4): 605–616.]
- Tomoyasu Y, Miller SC, Tomita S, Schoppmeier M, Grossmann D, Bucher G, 2008. Exploring systemic RNA interference in insects: A genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome*

- Biology*, 9(1): R10.
- Tzin V, Yang XW, Jing XF, Zhang K, Jander G, Douglas AE, 2015. RNA interference against gut osmoregulatory genes in phloem-feeding insects. *Journal of Insect Physiology*, 79(6): 105–112.
- Velez AM, Fishilevich E, 2018. The mysteries of insect RNAi: A focus on dsRNA uptake and transport. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 151(8): 25–31.
- Wuriyanghan H, Falk BW, 2013. RNA Interference towards the potato psyllid, *Bactericera cockerelli*, is induced in plants infected with recombinant tobacco mosaic virus (TMV). *PLoS ONE*, 8(6): e66050.
- Xiao D, Gao XW, Xu JP, Liang X, Li QQ, Yao JX, Zhu KY, 2015. Clathrin-dependent endocytosis plays a predominant role in cellular uptake of double-stranded RNA in the red flour beetle. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 60(3): 68–77.
- Yu N, Christiaens O, Liu J, Niu J, Cappelle K, Caccia S, Huvenne H, Smagghe G, 2013. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: An overview and future directions. *Insect Science*, 20(1): 4–14.
- Zhang J, Khan SA, Hasse C, Ruf S, Heckel DG, Bock R, 2015. Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. *Science*, 347(6225): 991–994.
- Zhang ZJ, Wang XB, Wang H, Liu L, Zhang XG, He XX, 2014. Study on Chinese tomato yellow leaf curl virus-induced gene silencing (VIGS) via root absorption. *Biotechnology Bulletin*, (1): 143–146. [张召军, 王晓彬, 王慧, 刘林, 张心阁, 何秀霞, 2014. 中国番茄黄化曲叶病毒利用根吸收法诱导基因沉默 (VIGS) 的初步研究. 生物技术通报, (1): 143–146.]
- Zhong QF, LI WJ, Yin FY, Zhang DY, Chen L, Chen Y, Zeng M, Cheng ZQ, 2019. A piece of rice vacuum infiltration equipment and its use method. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 35(27): 17–22. [钟巧芳, 李维蛟, 殷富有, 张敦宇, 陈玲, 陈越, 曾民, 程在全, 2019. 一种水稻真空渗透转化装置及方法的研究. 中国农学通报, 35(27): 17–22.]
- Zhou T, 2010. Establishment of TRV-mediated virus-induced gene-silencing system for potato and functional characterization of some resistance related genes. Master dissertation. Wuhan: Huazhong Agricultural University. [周婷, 2010. TRV 介导的马铃薯基因瞬时沉默体系建立及部分抗病相关基因功能初步鉴定. 硕士学位论文. 武汉: 华中农业大学.]
- Zhu KY, Palli SR, 2020. Mechanisms, applications, and challenges of insect RNA interference. *Annual Review of Entomology*, 65: 293–311.
- Zong J, Yao X, Yin J, Zhang D, Ma H, 2009. Evolution of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) genes: Duplications and possible losses before and after the divergence of major eukaryotic groups. *Gene*, 447(1): 29–39.