

RNA Silencing Antagonizes Viroid

Xiangpeng Kang

Research Center for Plant RNA Signaling, College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou Zhejiang

Email: 972789728@qq.com

Received: Oct. 11th, 2019; accepted: Dec. 17th, 2019; published: Dec. 24th, 2019

Abstract

RNA silencing plays an important role in plant against pathogens invasion, especially in the process of viral infection. When exogenous RNA or viruses enter plant cells, RNA silencing is activated, thereby minimizing any detrimental effects of pathogenic RNAs on cells. Viroid, a special kind of non-coding RNA, due to its special structures, provides an excellent and extraordinary model for studying the interplay between RNA silencing and pathogenic RNAs in cells.

Keywords

RNA Silencing, Viroid, RNA Induced Silencing Complex (RISC), Dicer, Small RNA

RNA沉默拮抗类病毒

康相鹏

杭州师范大学生命与环境科学学院RNA信号传导研究中心, 浙江 杭州

Email: 972789728@qq.com

收稿日期: 2019年10月11日; 录用日期: 2019年12月17日; 发布日期: 2019年12月24日

摘要

RNA沉默在植物对抗外源性病原入侵, 尤其是病毒入侵的过程中具有重要作用, 当外源RNA或病毒进入植物细胞时, RNA沉默被激活, 从而把外源病原性RNA和病毒等对细胞的影响降到最低程度。类病毒这种非编码RNA由于其特殊的结构, 为研究RNA沉默和非编码RNA在植物中的互作提供了绝佳的模型。

关键词

RNA沉默, 类病毒, RNA沉默复合体, Dicer, 小RNA分子

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

RNA 沉默是生物中普遍存在的一种应激机制, 具体来说: RNA 沉默是真菌、动物以及植物对抗致病性病原入侵的一种防御的机制。同时, RNA 沉默也是细胞内的一种基因调节机制, 其生物化学框架在真菌、植物和动物中都是保守的[1] [2]。在植物中, RNA 沉默形成了抵御病原感染的先天防御机制[3] [4]。当外源 RNA 等进入植物细胞时, RNA 沉默机制被激活, 进而把外源 RNA 等对细胞的影响降低到最低程度。因此, 从这个意义上来说, RNA 沉默可以称为细胞内的“免疫系统”。

类病毒是高等植物的感染性物质, 其分子结构是环状的非编码 RNA (ncRNA), 已知的类病毒 RNA 大小在 246 到 401 个核苷酸之间[5]。类病毒不编码蛋白质, 必须与宿主的细胞因子互作用才能完成其大部分或全部生物功能[6]。类病毒由于其独特的基因序列及结构特征, 为研究宿主-病原互作用提供了一种很好的研究方法[7]。同时, 由于类病毒侵染多种经济作物、造成重大经济损失, 甚至会对某些经济作物造成毁灭性打击。因此, 对于类病毒的深入研究还将有利于减少类病毒对经济作物造成的损失, 具有十分重要的经济价值。

2. RNA 沉默

2.1. RNA 沉默

RNA 沉默是基因表达的一种调控机制, 同时也是真菌、植物和动物对抗病原入侵等生理过程中的调节和防御机制[8] [9] [10]。RNA 沉默在植物、动物、线虫和真菌等真核生物中广泛存在, 是一种高度保守的、序列特异的 RNA 降解机制。RNA 沉默在动、植物中可以从一个细胞传播到另一个细胞, 甚至在真菌和植物之间 RNA 沉默也可以互相传播。这个过程是由基因决定的, 移动 RNA 信号则是必需的, 这种现象被称为“非细胞自主 RNA 沉默” [4]。

非细胞自主 RNA 沉默是由移动信号和各种遗传因素共同决定的。DCL2 对于非细胞自主性 RNA 沉默来说是极为重要的, 也是传递沉默的必要条件[4]。然而, 非细胞自主 RNA 沉默和相应移动信号的性质, 仍然是尚未研究清楚的两个问题, 也是植物 RNA 沉默领域最具争议的话题。非细胞自主 RNA 沉默可以向上从根到芽, 也可以向下从芽到根传播。但在不同的植物中, 向上或向下移动沉默的机制可能有差异[4]。移动沉默信号, 通过胞间连丝从一个细胞传递到另一个细胞, 而不是由韧皮部扩散的结果[4]。目前为止, 关于系统性沉默的研究很多都集中在非细胞自主 RNA 沉默的长距离向上转运[4]。同时, 非细胞自主 RNA 沉默涉及到同源序列的特定靶向性, 可以发生在转录水平和转录后水平, 被称为转录基因沉默和转录后基因沉默(TGS 和 PTGS) [7]。

2.2. 转录后基因沉默

转录后基因沉默(PTGS)作为植物的自然防御机制, 是指基因能够进行转录, 但转录的 mRNA 在细胞质中积累量很低, 甚至检测不到[8]。需要指出的是 PTGS 是一种依赖于 DCL2 的转录后 RNA 沉默机制[9]。细胞核内转录的 mRNA 进入细胞质后, 和植物内源基因或同源病毒核酸形成 dsRNA, 随后发生降解, 导致共抑制现象[9]。PTGS 是利用对转录的特定序列进行降解使稳定表达的 miRNA 数量减少的现象, 只针对 mRNA 进行处理, 不涉及靶基因的转录效率, 至少不涉及起始转录效率[10] [11]。转录后基因沉默是

在牵牛花转基因研究中发现的共抑制现象[1]，随后在秀丽隐杆线虫及其他动、植物的过程中得到进一步证实，该过程涉及 siRNA 生成的起始阶段和靶 mRNA 降解的效应阶段[12]。此外，利用植物病源性基因的 dsRNA 可以直接引发 PTGS [13]。

2.3. 转录基因沉默

转录水平的基因沉默(TGS)是由于某些细胞代谢异常使得启动子失活，不能正常进行起始转录的现象[14]，这一过程主要涉及以下四种因素：

1) 启动子甲基化。甲基化作为活细胞的一种 DNA 共价修饰方式，一般发生在 DNA 的 CG、CNG 及 CHH 序列的胞嘧啶碱基位置，进而导致转录受到抑制。

2) 重复序列。外源基因通过多拷贝的形式整合到同一位点形成头对头、尾对尾的反向重复，导致表达无法正常进行，且拷贝数越多，沉默越严重。

3) 反式失活。由于启动子区域的同源性而诱导基因沉默的现象即反式失活。启动子区域只要有 90 bp 的同源序列，就能引起两个基因间发生反式失活。

4) 位置效应。位置效应指基因在基因组中的位置对其表达的影响。当外源基因打乱基因组的正常组合，生物中的甲基化酶被激活，导致外源基因甲基化而失活。

3. RNA 沉默复合体

3.1. Dicer

Dicer 最初在动物中发现，在植物中被称为：Dicer-Like protein (DCL)。DCLs 基因可以编码 DCLs 蛋白，这些蛋白在小 RNA 产生过程中具有重要的促进作用，这一过程中小 RNA 可以使参与植物发育和防御病毒及病原体的基因沉默。在植物中通常有至少 4 种 DCLs [3]，其中在拟南芥突变体中的相关研究最为深入。虽然这些 DCLs 结构相似，但它们都可以在不同的途径中发挥各自的功能。

研究表明，DCL1 与 miRNA 的产生有关，DCL1 主要存在于产生 miRNA 的细胞核中[15]。DCL2 主要切割病毒源的 dsRNA，从而产生 22nt 的 siRNA，进而表现出对病毒的抵抗作用。DCL2 还可能在病毒防御中发挥一定作用，可以在胞间和系统 PTGS 信号结合。DCL2 在增强沉默信号方面也有重要作用。与 DCL1、DCL2 不同的是，DCL3 的切割产物是 24nt siRNA 并且 DCL3 的识别并切割的是高度重复序列，DCL3 产生的 siRNA 参与到具有重复序列 DNA 的甲基化和染色体修饰过程[9]。DCL4 负责 21nt siRNA 的产生，比如能够识别黄瓜花叶病毒(CMV)的卫星 RNA 形成的二级结构，切割产生 siRNA，说明 DCL4 对可以形成二级结构的单链 RNA 表现出切割作用。值得注意的是：DCL2 被认为是 DCL4 和 DCL3 以及系统 PTGS 中的移动 siRNAs 的关键参与者。

3.2. AGOs

Argonaute (AGOs)蛋白是 RISC 的核心元件，具有独特的生化功能和结构特征[16] [17] [18] [19]。在不同的物种中存在多种 Argonaute 家族蛋白，如果蝇中存在 AGO-1 和 AGO-2 [20] [21]。尽管 AGOs 家族都具有类似的结构，但研究表明只有 AGO2 才是 RISC 中的功能组分[22]。在 RISC 装配的过程中，AGOs 蛋白与 siRNA 结合，同时催化 RISC 对靶 RNA 的特异性切割。siRNA 在 RNAi 过程中作为特异性切割作用的“向导”，这一过程中遵循碱基互补配对原则[22]。Dicer 酶在 RNAi 过程中催化 dsRNA 切割 siRNA 的反应，随后与 siRNA 及其他的蛋白组分一起参与 RISC 装配的起始阶段。Dicer 酶具有独立的催化活性，但在催化 dsRNA 降解为 siRNA 的过程中还需要其他蛋白进行辅助[22]。除了结合 siRNAs，AGOs 还可以催化 RISC 对靶 RNA 的特异性切割。

3.3. 小 RNA

小 RNA 在真核生物中构成了一个大的具有多种功能的调节分子家族。他们的主要特点是依赖于双链 RNA (dsRNA), 用 DCLs 进行生物合成。目前, 研究较为清楚的是三种小 RNA, 即 miRNA、siRNA 和 piRNA。siRNA 和 miRNA 都是在 Dicer 酶的切割下产生的[23]。miRNA 是一种相对保守的小非编码 RNA, 可以在转录后水平对基因表达进行负调节[23]。siRNA 是一种能够保护基因组病毒、移动遗传因子, 以及其他 DNA 入侵的有效自我防护系统。piRNA 是由一种 Argonaute 依赖性的机制产生的, 会抑制哺乳动物中转座子和逆转录原件的功能。

3.4. 非细胞自主性 RNA 沉默

3.4.1. 细胞间 RNA 沉默

非细胞自主的 RNA 沉默涉及两个相互关联但又截然不同的过程——细胞间和胞内沉默的远距离传播, 通常被称为细胞间和系统性沉默[4]。细胞间沉默是基于农杆菌渗透的局部沉默试验, 细胞间沉默是一个首要前提, 但不一定会导致系统性的非细胞自主的 RNA 沉默。在不同的拟南芥 DCL4 突变体中也观察到 PTGS 在细胞间的传播, 表明 DCL4 可能在非细胞自主 RNA 沉默中起抑制作用。因此, DCL4 和 DCL4 加工的 21nt siRNA 是否是细胞间 PTGS 所必需的, 还需要进一步的研究[4]。SNF2、JmJc 结构蛋白 JMJ14、THO、等也被认为和细胞间非细胞自主 RNA 沉默有一定的关系。siRNA 信号的放大对于拟南芥细胞间 RNA 沉默的传递也是必需的[4]。

3.4.2. RNA 沉默长距离扩散

系统性 RNA 沉默, 又称作细胞自主 RNA 沉默的长距离传播。局部组织的沉默可以通过韧皮部运输通道转移到远端组织中, 或者也可以通过嫁接法连接从砧木到接穗诱导系统非细胞自主 RNA 沉默[4]。AGO4 部分参与了非细胞自主 PTGS 的信号接收。在远端受体细胞中, DCL4 和 DCL2 分别产生 21 和 22nt siRNAs, 这一过程中靶 mRNA 被降解, 从而导致转录后基因沉默(PTGS)。“siRNA 迁移率分析”证实了所有正义链和反义链 L-siRNAs 都可以在植物中从一个细胞移动到另一个细胞, 最终完成长距离扩散[4]。

4. RNA 沉默拮抗植物病毒

4.1. RNA 沉默对病毒的拮抗作用

RNA 沉默作为植物先天免疫的关键, 在调节发育、维持基因组稳定性、对抗外部环境压力等方面具有重要作用。RNA 沉默的关键是小 RNA 分子, 根据来源通常被分为: siRNAs、miRNA 及 piRNA [24]。植物中 RNA 沉默对病毒的拮抗可以概括为四个步骤: 1) 对病毒 RNA 的识别, 在此期间产生病毒源的 siRNA (vsiRNA); 2) siRNA 扩增, 产生次级 vsiRNA; 3) vsiRNA 与 AGOs 结合, 形成 RISC, 降解病毒 RNA 或介导病毒 DNA 甲基化修饰; 4) 系统沉默信号的传播及沉默体系的建立, 从而产生对植物病毒的拮抗作用[24]。因此, RNA 沉默作为植物中自然存在的抗病毒机制, 当外源病毒进入植物中时, 病毒诱导的基因沉默(VIGS)将发挥作用。当病毒诱导的 RNA 沉默产生后, 可以迅速扩散到整个植株, 从而表现出对病毒的拮抗作用[25], 在这一过程中控制病毒粒子的复制, 被认为是 RNA 沉默最主要的作用[26]。

4.2. 植物病毒拮抗 RNA 沉默(沉默抑制子)

大部分植物病毒通常会编码多种不同的 RNA 沉默抑制因子, 从而对宿主的 RNA 沉默体系进行抑制, 帮助病毒战胜宿主的 RNA 沉默机制, 完成侵染并成功复制。如果植物病毒在植物拮抗病毒的四个步骤中“跑”的快过沉默信号, 编码不同的 RNA 沉默抑制因子, 从而对宿主的 RNA 沉默进行抑制, 帮助病毒

有效拮抗宿主的 RNA 沉默，侵染并成功进行复制；反之亦然[27]。

病毒编码的蛋白中有一类具有抑制基因沉默的功能，能够对抗宿主基于 RNA 的病毒免疫。1998 年发现植物病毒沉默抑制因子后，科学家们从多种植物病毒中发现了 RNA 沉默抑制因子。植物病毒几乎都可以编码 RNA 沉默抑制因子，如单链的烟草花叶病毒(TMV)，通常植物病毒都会编码多个沉默抑制因子[27]。在植物中 RNA 沉默是由 siRNA 和 miRNA 介导的，因此植物病毒沉默抑制因子也是通过这两种途径对沉默信号进行抑制从而完成侵染植物的过程。在植物病毒与宿主长期共同进化的过程中，一些植物病毒会在 siRNA 以及 miRNA 介导的沉默途径中编码一些抑制蛋白来对抗这种机制，使其作用受到限制[27]。

5. 类病毒

5.1. 类病毒的分类

根据类病毒存在于植物细胞中的部位可分为：核类病毒与叶绿体类病毒[28]；根据类病毒的分子特征可分为：马铃薯纺锤块茎类病毒科与鳄梨白斑类病毒科[5] [29] [30]。核类病毒在植物细胞的细胞核中被发现，并在核中进行复制等生理过程，马铃薯纺锤块茎类病毒科是核类病毒，该科成员一般都在分子中间部分含有 CCR (特征性中央保守区)；叶绿体类病毒(鳄梨白斑类病毒科)在植物的叶绿体中被发现，在叶绿体中进行复制等生理过程，鳄梨白斑类病毒科成员属于叶绿体类病毒，叶绿体类病毒没有像核类病毒一样的 CCR (特征性中央保守区) [5] [27]，通过不对称方式实现滚环复制[27]；鳄梨白斑类病毒科成员没有 CCR，但一般都具有锤头状核酶，通过对称方式实现滚环复制[27]。

5.2. 类病毒侵染植物

类病毒侵染植物的过程中，通过摩擦接种或机械传播的方式进行。当进入宿主细胞后时，以茄潜隐类病毒(ELVd)为代表的鳄梨白斑类病毒科从细胞质移动到细胞核，随后从细胞核传递到叶绿体，在叶绿体中，这种致病性 RNA 可以有效地复制和积累[31] [32]。而在以马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)为代表的马铃薯块茎类病毒科成员则是进入到细胞后，在细胞核的核质中进行复制，然后运输到核仁，在核质、核仁中都有分布。

类病毒侵染植物的过程可以大致分为以下七个步骤：1) 进入细胞器(鳄梨白斑类病毒科为叶绿体、马铃薯纺锤块茎类病毒科为细胞核)(见图 1(a))；2) 细胞器内的复制(见图 1(a))；3) 复制完成后从细胞器进入胞浆(见图 1(a))；4) 转运到邻近细胞(见图 1(a))；5) 进入韧皮部(见图 1(b))；6) 从韧皮部侵入维管组织，进行复制和运输[33] [34] [35] [36] [37] (见图 1(b))；7) 经维管组织到达叶片和根等的长距离运输[6] (见图 1(c))。类病毒在完成以上七个步骤之后，才算成功完成对植物的侵染，并引起植物病害。

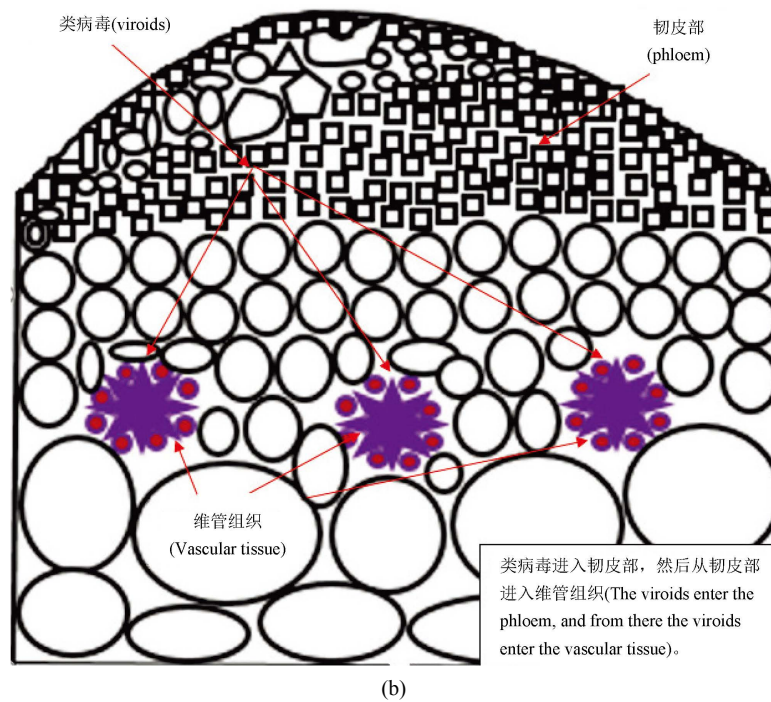
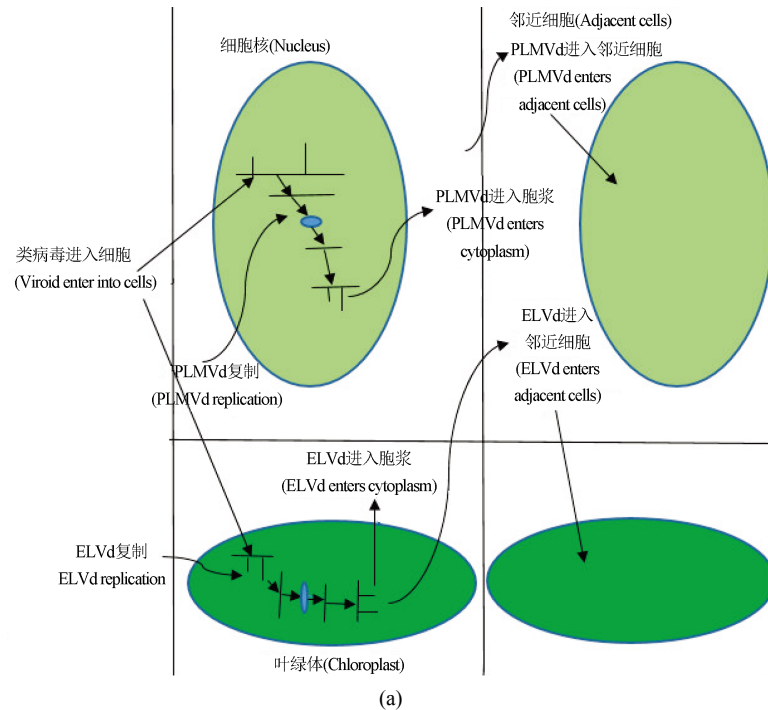
5.3. RNA 沉默拮抗类病毒

所有的生物都进化出了各种防御病原体入侵的机制。因此，在宿主中的存活是包括类病毒在内的病原体成功侵染宿主的首要前提[33]。类病毒这种外源、非编码、无蛋白外壳的类病毒 RNA 如何在宿主细胞的 RNA 监视和降解系统中存活[34]？这一问题对研究类病毒与宿主细胞的共同进化、细胞 RNA 降解机制具有重要意义。尽管这一点十分重要，生物学界对这一问题的研究才刚开始，我们离答案还很遥远，但在学界的共同努力下，这一问题的解决是可以预期的。根据目前的研究来看，RNA 沉默在植物拮抗类病毒的过程中具有十分重要的作用，而 Dicer 则是 RNA 沉默拮抗类病毒的重要途径之一。

5.3.1. Dicer 对类病毒的拮抗作用

植物对类病毒的拮抗主要有：RNA 沉默、核酸酶降解、RNA 修饰三种途径，这三种途径中最重要的是 RNA 沉默途径[34]。Dicer-Like (DCL)蛋白及相关蛋白催化裂解双链 RNA，产生双链 miRNA 或 siRNA

分子。这种双链中的一条被并入 RNA 诱导的沉默复合体(RISC)中引导靶 RNA 的降解或翻译抑制，或者进入 RNA 诱导的沉默复合物的引发物，诱发 DNA 甲基化和染色质修饰[35] [36] [37]。RNA 沉默对类病毒的拮抗作用，主要取决于 DCLs。在植物中，RNA 沉默形成了抵御外来病原感染的先天防御体系[15]。大多数植物编码四种 DCLs，DCL1 产生 miRNA，DCL2、DCL3、DCL4 分别产生 22nt、24nt、21nt 的 siRNA [12] [38]。RNA 沉默的关键介质是 21 至 24nt 小 RNA [35]。通常认为植物类病毒基因组 RNAs 复制产物在 DCL 分裂时充当底物，这导致小 RNA 随后指导 RISC 分裂类病毒 RNA。



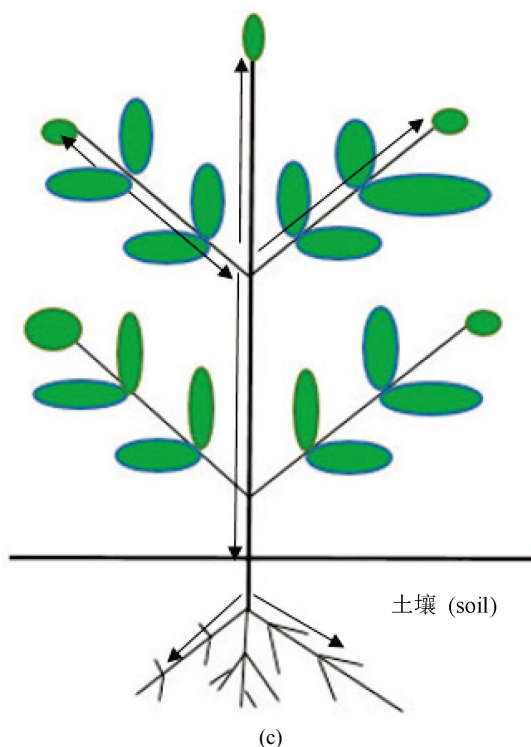


Figure 1. The process of viroid infect plants. (a) The process of viroid entering the organelle, replicating in the organelle, entering the cytoplasm after replication, and transporting to the adjacent cells. After viroid replication begins, the hairpin viroid molecules unscrew and become linear molecules, then loop, re-line, and refold to form hairpin viroid molecules, which enter the cytoplasm from the organelles and are eventually transferred to adjacent cells. (b) The phloem and vascular tissues are marked with red arrows, and the process of viroids entering the phloem and vascular tissues for long-distance transmission is marked. (c) The direction of viroids in plants after transmission through vascular tissues and finally completing the process of infection in plants

图 1. 类病毒侵染植物的过程。(a) 显示了类病毒进入细胞器、在细胞器中复制、复制完成后进入胞浆、转运到邻近细胞的过程。当类病毒复制开始后，A 中发卡状的类病毒分子解旋，成为线性分子，随后环化、再次线性、重新折叠形成发卡状的类病毒分子，从细胞器中进入胞浆，最后传递到邻近细胞。进入细胞器时分为两种情况，即鳄梨白斑类病毒科进入叶绿体、马铃薯纺锤块茎类病毒科进入细胞核。(b) 韧皮部、维管组织在图中用红色箭头标出，同时用红色箭头标出类病毒进入韧皮部、维管组织并进行远距离传播的过程。(c) 用黑色箭头标出经维管组织传播后类病毒在植物中的传播方向并最终完成对植物的侵染的过程

核酸酶降解是类病毒在宿主中生存的潜在威胁，如在啤酒花花粉成熟过程中，啤酒花潜隐类病毒(HLVd)的降解是选择性的，而这种降解不是 RNA 沉默的结果，因为降解产生的 100-230nt RNA 并不是具有典型沉默特征的啤酒花潜隐类病毒(HLVd)特异性 21-24nt 小 RNA [35]。

宿主抑制类病毒感染的一个潜在机制是修饰类病毒 RNA 的碱基，使 RNA 与宿主因子的作用失去活性[36]。

5.3.2. 类病毒小 RNA

目前一般认为：类病毒小 RNA 一般是来源于类病毒基因组的 21-24nt 的小 RNA，而类病毒小 RNA 大小和积累水平与 DCL 活性和类病毒底物密切相关[29]。类病毒小 RNA 的生物发生机制尚不明确，但现有的序列分析信息表明，这些小 RNA 大多是由类病毒基因组 RNA 的某些区域衍生而来的。由于常规的 cDNA 克隆存在一定的局限性，因此深入测序是获得更全面的类病毒小 RNA 的必要条件。在被类病毒感染植物中，通常存在较高水平的类病毒小 RNA 积累[35] [39]，类病毒小 RNA 可以显著的抑制 RNA 沉默复合体 RISC 对它的作用，进而使得类病毒侵染植物之后的一系列活动能够顺利进行。

6. 展望

RNA 沉默作为植物抗病毒的重要机制, 在植物对抗病原入侵的过程中具有重要作用。类病毒作为一类新型病原 RNA 分子, 已知的宿主只有约三十种植物。植物中 RNA 沉默如何拮抗类病毒, 目前的研究有了一定的进展, 但对于 RNA 沉默拮抗类病毒、类病毒如何巧妙的对抗 RNA 沉默的拮抗作用, 研究的还不是十分清楚。RNA 沉默拮抗类病毒以及类病毒如何巧妙的对抗 RNA 沉默对它的影响等等都是十分有趣的, 并将对相关研究起到极大的推动作用。

在被发现并得到确认之后的很长一段时间中, 类病毒的研究主要集中在马铃薯纺锤块茎类病毒科的类病毒上, 而对于鳄梨白斑类病毒科的类病毒研究相对较少。鳄梨白斑类病毒科成员的数量很少, 宿主范围狭窄, 仅仅可以在发现它们的物种或与之亲缘性比较接近的少数植物中寄生[11] [39]。这一特性在过去的几十年中限制了对这些有趣 RNA 的研究[30], 然而鳄梨白斑类病毒科成员作为已知可以进入并在叶绿体中复制的 RNA [30], 由于这种特性, 鳄梨白斑类病毒科成员可作为一种基础性的工具, 为研究细胞中 RNA 转运机制提供了有力的帮助。尤其是茄潜隐类病毒(ELVd)是该科最友好的实验系统, RNA 复制、加工和转运, 甚至一些生物技术的应用, 都是由于使用 ELVd 而取得实质性突破[5]。这预示着, 在可预期的很长一段时间中, 以 ELVd 为代表的鳄梨白斑类病毒科成员的研究将成为类病毒研究的热点内容和主要方向。

致 谢

在本综述的撰写过程中, 获得杭州师范大学生命与环境科学学院 RNA 信号传导研究中心资助, RNA 信号传导研究中心老师提出建议并阅读、修改文稿, 特此致谢。

参考文献

- [1] 王永, 陈锐, 朱珠, 兰青阔, 赵新. 真菌 RNA 沉默研究进展[J]. 天津农业科学, 2014, 20(5): 5-13.
- [2] Li, F. and Ding, S.-W. (2006) Virus Counter Defense: Diverse Strategies for Evading the RNA-Silencing Immunity. *Annual Review of Microbiology*, **60**, 503-531. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142205>
<https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.micro.60.080805.142205>
- [3] Qin, C., Li, B., Fan, Y.-Y., Zhang, X., Yu, Z.-M., Ryabov, E., Zhao, M., Wang, H., Shi, N.-N., Zhang, P.-C., Jackson, S., Tör, M., Cheng, Q., Liu, Y.-L., Gallusci, P. and Hong, Y.-G. (2017) Roles of Dicer-Like Proteins 2 and 4 in Intra- and Intercellular Antiviral Silencing. *Plant Physiology*, **174**, 1067-1081. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00475>
<http://www.plantphysiol.org/content/plantphysiol/174/2/1067>
- [4] Jones, R.M.W., Bartel, D.P. and Bartel, B. (2006) MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, **57**, 19-53. https://www.sdbonline.org/sites/2008ShortCourse/Rhoades_review.pdf
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105218>
- [5] Jose, A.-D. (2016) Eggplant Latent Viroid: A Friendly Experimental System in the Family Avsunviroidae. *Molecular Plant Pathology*, **17**, 1170-1177. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26696449>
<https://doi.org/10.1111/mpp.12358>
- [6] Martinez, F., Marques, J., Salvador, M.L. and Daròs, J.A. (2009) Mutational Analysis of Eggplant Latent Viroid RNA Processing in *Chlamydomonas reinhardtii* Chloroplast. *Journal of General Virology*, **90**, 3057-3065. https://www.researchgate.net/publication/26736586_Mutational_analysis_of_eggplant_latent_viroid_RNA_processing_in_Chlamydomonas_reinhardtii_chloroplast
<https://doi.org/10.1099/vir.0.013425-0>
- [7] Anna, G.-S. (2004) Viroids: Unusual Small Pathogenic RNAs. *Acta Biochimica*, **51**, 587-607. http://www.actabp.pl/pdf/3_2004/587.pdf
https://doi.org/10.18388/abp.2004_3546
- [8] Zhang, X., Lai, T.-F., Zhang, P.-C., Zhang, X.-L., Yuan, C., Jin, Z.-H., Li, H.-M., Yu, Z.-M., Qin, C., Tör, M., Ma, P., Cheng, Q. and Hong, Y.-G. (2019) Mini Review: Revisiting Mobile RNA Silencing in Plants. *Plant Science*, **278**, 113-117. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016894521830640X>
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.10.025>

- [9] David, B. (2004) RNA Silencing in Plants. *Nature*, **431**, 356-363. <https://doi.org/10.1038/nature02874>
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016894521830640X>
- [10] Sarkies, P. and Miska, E.A. (2014) Small RNAs Break out: The Molecular Cell Biology of Mobile Small RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **15**, 525-535. <https://www.nature.com/articles/nrm3840>
<https://doi.org/10.1038/nrm3840>
- [11] 曹雪松, 田野. 植物基因沉默的研究进展[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2010, 23(1): 45-48.
- [12] 陈大元, 张利生. RNA 干涉及其应用前景[J]. 遗传, 2003, 25(3): 341-344.
- [13] Bender, J. (2001) A Vicious Cycle: RNA Silencing and DNA Methylation in Plants. *Cell*, **106**, 129-132.
<https://core.ac.uk/download/pdf/82155567.pdf>
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00441-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00441-X)
- [14] Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R. (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in Trans. *The Plant Cell*, **2**, 279-289.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC159885/pdf/020279.pdf>
<https://doi.org/10.2307/3869076>
- [15] 王健伟, 宋敬东, 吴国屏, 韩金祥, 洪涛. RNA 干扰机制的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(3): 409-411.
- [16] 韩婧. 基因沉默及克服策略[J]. 沧州师范学院学报, 2006(4): 54-55.
- [17] Aliyari, R. and Ding, S.-W. (2009) RNA-Based Viral Immunity Initiated by the Dicer Family of Host Immune Receptors. *Immunological Reviews*, **227**, 176-188. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00722.x>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2676720/pdf/nihms-106453>
- [18] Chen, W.-W., Zhang, X., Fan, Y.-Y., Ryabov, E., Shi, N.-N., Zhao, M., Yu, Z.-M., Qin, C., Zheng, Q.-Q., Zhang, P.-C., Wang, H.-Z., Jackson, S., Cheng, Q., Liu, Y.-L., Gallusci, P. and Hong, Y.-G. (2018) A Genetic Network for Systemic RNA Silencing in Plants. *Plant Physiology*, **176**, 2700-2719. <http://www.plantphysiol.org/content/176/4/2700>
<https://doi.org/10.1104/pp.17.01828>
- [19] 黄迪南, 崔世权, 侯敢. siRNA 诱导基因沉默复合物(RISC)的研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(7): 2799-2803.
- [20] Nakanishi, K., Weinberg, D.E., Bartel, D.P. and Patel, D.J. (2012) Structure of Yeast Argonaute with Guide RNA. *Nature*, **486**, 368-374. <https://www.nature.com/articles/nature11211>
<https://doi.org/10.1038/nature11211>
- [21] Kuhn, C.D. and Joshua-Tor, L. (2013) Eukaryotic Argonautes Come into Focus. *Trends in Biochemical Sciences*, **38**, 263-271. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23541793>
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.02.008>
- [22] Swarts, D.C., Makarova, K., Wang, Y.L., Nakanishi, K., Ketting, R.F., Koonin, E.V., Patel, D.J. and John, V.D.O. (2014) The Evolutionary Journey of Argonaute Proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, **21**, 743-753.
<https://www.nature.com/articles/nsmb.2879.pdf>
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2879>
- [23] 杜立新, 燕飞, 宋雪梅. RNA 诱导沉默复合物中的生物大分子及其装配[J]. 遗传, 2006, 28(6): 761-766.
- [24] Williams, R.W. and Rubin, G.M. (2002) Argonaute1 Is Required for Efficient RNA Interference in Drosophila Embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 6889-6894.
<https://www.pnas.org/content/pnas/99/10/6889.full.pdf>
<https://doi.org/10.1073/pnas.072190799>
- [25] 章涛, 陈代雄. RNA 诱导沉默复合物(RISC)功能研究进展[J]. 遵义医学院学报, 2006, 29(2): 184-187.
- [26] 李毅, 蒋琳, 魏春红. 病毒基因沉默抑制子及其作用机制[J]. 中国科学: 生命科学, 2012, 42(1): 16-28.
- [27] 张飞云, 王法军, 梁越. 植物病毒沉默抑制因子研究进展[J]. 生物技术通报, 2009(2): 1-5.
- [28] Gómez, G. and Pallás, V. (2010) Noncoding RNA Mediated Traffic of Foreign mRNA into Chloroplasts Reveals a Novel Signaling Mechanism in Plants. *PLoS ONE*, **5**, 1517-1519.
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/psb.5.11.13711?scroll=top&needAccess=true>
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012269>
- [29] Molina, S.D., Suay, L., Salvador, M.L., Flores, R. and Daròs, J.A. (2007) Processing of RNAs of the Family Avsunviroidae in *Chlamydomonas reinhardtii* Chloroplasts. *Journal of Virology*, **81**, 4363-4366.
<https://jvi.asm.org/content/jvi/81/8/4363>
<https://doi.org/10.1128/JVI.02556-06>
- [30] Gustavo, G. and Pallás, V. (2012) A Pathogenic Non Coding RNA That Replicates and Accumulates in Chloroplasts Traffics to This Organelle through a Nuclear-Dependent Step. *Plant Signaling & Behavior*, **7**, 882-884.

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3583980>
<https://doi.org/10.4161/psb.20463>
- [31] Landry, P. and Perreault, J.P. (2005) Identification of a Peach Latent Mosaic Viroid Hairpin Able to Act as a Dicer-Like Substrate. *Journal of Virology*, **79**, 6540-6543. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.10.6540-6543.2005>
- [32] 黄家风, 许文博. 植物类病毒研究进展[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2007, 25(3): 18-23.
- [33] Nohales, M.A., Molina, S.D., Flores, R. and Daròs, J.A. (2012) Involvement of the Chloroplastic Isoform of tRNA Ligase in the Replication of Viroids Belonging to the Family Avsunviroidae. *Journal of Virology*, **86**, 8269-8276. <https://jvi.asm.org/content/jvi/early/2012/05/16/JVI.00629-12.full.pdf>
<https://doi.org/10.1128/JVI.00629-12>
- [34] Gómez, G. and Pallás, V. (2012) Studies on Subcellular Compartmentalization of Plant Pathogenic Noncoding RNAs Give New Insights into the Intracellular RNA-Traffic Mechanisms. *Plant Physiology*, **7**, 882-884. <http://www.plantphysiol.org/content/159/2/558>
<https://doi.org/10.1104/pp.112.195214>
- [35] Ding, B. (2009) The Biology of Viroid-Host Interactions. *Annual Review of Phytopathology*, **47**, 105-131. <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-phyto-080508-081927>
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081927>
- [36] Ding, B. and Itaya, A. (2007) Viroid: A Useful Model for Studying the Basic Principles of Infection and RNA Biology. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **20**, 7-20. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/MPMI-20-0007>
<https://doi.org/10.1094/MPMI-20-0007>
- [37] Flores, R., Hernández, C., Alba, A.E., Mde, Daròs, J.A. and Serio, F.D. (2005) Viroids and Viroid-Host Interactions. *Annual Review of Phytopathology*, **43**, 117-139. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140243>
<https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140243>
- [38] Tabler, M. and Tsagris, M. (2004) Viroids: Petite RNA Pathogens with Distinguished Talents. *Trends in Plant Science*, **9**, 339-348. <https://cals.arizona.edu/mycoherb/arnoldlab/teaching/2011%20stuff/Viroids.pdf>
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.05.007>
- [39] Csorba, T., Kontra, L. and Burgyán, J. (2015) Viral Silencing Suppressors: Tools Forged to Fine-Tune Host-Pathogen Coexistence. *Virology*, **479**, 85-103. http://real.mtak.hu/26668/1/2015_VSR_Virology.pdf
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.028>