Small non-coding RNA 발현하는 형질전환 벼의 환경위해성 평가 방법

진병준 · 전현진 · 조현민 · 이수현 · 최철우 · 정욱현 · 백동원 · 한창덕 · 김민철

Methods for environmental risk assessment of rice transgenic plants expressing small non-coding RNA

Byung Jun Jin · Hyun Jin Chun · Hyun Min Cho · Su Hyeon Lee · Cheol Woo Choi · Wook-Hun Jung · Dongwon Baek · Chang-deok Han · Min Chul Kim

Received: 21 August 2019 / Revised: 26 August 2019 / Accepted: 26 August 2019
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Since the RNA interference (RNAi) had been discovered in many organisms, small non-coding RNA-mediated gene silencing technology, including RNAi have been widely applied to analysis of gene function, as well as crop improvement. Despite the usefulness of RNAi technology, RNAi transgenic crops have various potential environmental risks, including off-target and non-target effects. In this study, we developed methods that can be effectively applied to environmental risk assessment of RNAi transgenic crops and verified these methods in 35S::dsRNAi *eGFP* rice transgenic plant we generated. Off-target genes, which can be non-specifically suppressed by the expression of dsRNAi *eGFP*, were predicted by using the published web tool, pssRNAit, and verified by comparing their expressions between wild-type (WT) and 35S::dsRNAi *eGFP* transgenic rice. Also, we verified the non-target effects of the 35S::dsRNAi *eGFP* plant by evaluating horizontal and vertical transfer of small interfering RNAs (siRNAs) produced in the 35S::dsRNAi *eGFP* plant into neighboring WT rice and rhizosphere microorganisms, respectively. Our results suggested that the methods we developed, could be widely applied to various RNAi transgenic crops for their environmental risk assessment.

Keywords Rice, RNA interference, Small non-coding RNA, Off-target effect, Environmental risk assessment

서론

RNA 간섭(RNA interference, RNAi) 현상은 진핵생물에서만 보고된 small non-coding RNA (small RNA)에 의한 유전자 발현억제 기작이며, 식물에서는 1990년에 최초로 보고되었다 (Sen and Blau 2006). Small RNA는 그 발생 원인인 이중가닥 RNA (double stranded RNA, dsRNA)의 생성과정에 따라 microRNA (miRNA)와 small interfering RNA (siRNA)로 크게 분류된다(Axtell 2013). miRNA는 하나의 유전자에서 전사된 단일 가닥의 RNA가 2차구조를 형성하여 dsRNA가 생성되는 반면, siRNA는 상보적 염기서열을 가지는 두 RNA들이 결합하여 dsRNA가 형성된다. 형성된 dsRNA는 Dicer에 의해서 21~25 nucleotide (nt) 길이의 small RNA (miRNA/siRNA)로 가공되어 RNA-induced silencing complex (RISC)를 형성하게 되며, 상보적 염기서열을 가지는 mRNA에 결합하여 전사체를 분해하거나 번역을 억제(Post Transcriptional Gene Silencing, PTGS)하는 것으로 알려져 있다(He and Hannon 2004). 또한, siRNA는 염색체 DNA에 결합하여 메틸화를 유도함으로써 유전자발현을 억제하게(Transcriptional Gene Silencing, TGS) 된다(Simon and Meyers 2011). Small RNA는 생성된 세포에서 뿐만 아니라(cell autonomous gene silencing), 원형질연락사를 통하여 주변의 세포로 이동하거나 체관부를 통해서 다른 기관으로 이동하여 유전자발현을 억제하는(cell non-autonomous gene silencing) 것으로도 알려져 있다(Melnik et al. 2011).

Small RNA에 의한 유전자 발현억제는 식물에서 특정 유전자의 발현을 억제하는 형질전환체 개발을 통하여 유전자

[†]These authors contributed equally to this work.

B. J. Jin[†] · H. J. Chun[†] · H. M. Cho · S. H. Lee · C. W. Choi · W.-H. Jung · D. Baek · C.-D. Han · M. C. Kim (✉)
경상대학교 응용생명과학부(BK21 Plus)
(Division of Applied Life Science (BK21 Plus), Institute of Agriculture & Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea)
e-mail: mckim@gnu.ac.kr

기능 연구뿐만 아니라, 농업적으로 유용한 작물을 개발하기 위해서 ‘Co-suppression’, ‘Antisense’, ‘double stranded RNA interference (dsRNAi)’, ‘Virus-induced gene silencing (VIGS)’, ‘Artificial miRNA’ 등의 다양한 방법들로 응용되어 왔다 (Ossowski et al. 2008; Auer and Frederick 2009; Kamthan et al. 2015). 최근에는 숙주유래 유전자발현억제(Host Induced Gene Silencing, HIGS) 기술을 이용한 병 저항성 작물 개발에도 널리 응용되고 있다(Zhang et al. 2016; Zhu et al. 2017). 하지만 PTGS 시스템을 이용한 형질전환 식물체에서 생성된 small RNA의 일부는 염기서열의 상보성에 따라 목표 유전자가 아닌 식물체 내재 유전자의 발현을 비 특이적으로 억제할 수 있는 가능성(off-target effect)이 제기되고 있다. 또한, 다양한 경로를 통하여 형질전환 식물체로부터 생태계로 유출된 small RNA들은 동일종 혹은 근연종 식물, 곤충, 근권미생물(Rhizosphere microorganism) 등 다른 생물체로 유입되어 상보적 유전자들의 발현을 억제(non-target effect) 할 수 있다는 환경위해성(environmental risk) 문제가 제기되고 있다(Auer and Frederick 2009; Ramesh 2013). 최근 연구보고에 의하면, 다양한 생물종들의 축적된 게놈 정보와 small RNA의 발생기작에 관련된 주요 단백질들의 기능 및 가공 단계별 특성들의 연구 결과를 기반으로 하여, small RNA를 발현하는 형질전환 식물이 가질 수 있는 off-target effect에 관한 생물정보학적 예측 도구 개발과 함께, 생태계 내에서의 small RNA의 이동 경로 추적 등을 통한 non-target effect 검증 등 small RNA를 발현하는 형질전환 식물에 대한 환경위해성 평가(environmental risk assessment, ERA) 방법이 개발되고 있다(Xu et al. 2006; Ramesh 2013). 하지만, 여전히 siRNA들의 off-target effect를 검증할 수 있는 구체적인 실험방법이나, 생태계 내에서의 siRNA들의 실질적인 이동성을 검증할 수 있는 체계화된 방법에 대한 연구는 미비한 실정이다.

본 연구에서는 현재 이용성이 증가하고 있는 small RNA를 발현하는 형질전환 작물의 환경위해성(off-target effect 및 non-target effect) 평가에 활용할 수 있는 효과적인 방법을 개발하고자 하였다. 이를 위하여 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼를 제조하였다. 먼저, 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼의 off-target effect를 검증하기 위해, 웹 기반 생물정보학 프로그램을 이용한 *in silico* 방식으로 off-target 유전자들을 예측하고, 예측된 off-target 유전자들의 발현을 검증할 수 있는 방법을 제시하였다. 또한, 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼에서 생성된 siRNA들의 주변 생태계로의 이동(non-target effect)을 검증할 수 있는 방법을 개발하였다. 본 연구결과를 통하여 small RNA를 발현하는 형질전환 작물이 가질 수 있는 환경위해성을 체계적으로 평가할 수 있는 방법을 제시하고자 하였다. 또한, 본 논문에서 제시한 검증방법들은 현재 이용성이 증가하고 있는 RNAi 형질전환 작물의 안전성 평가에 활용가치가 클 것으로 사료된다.

재료 및 방법

35S::dsRNAi_eGFP 발현 형질전환 벼 제조

eGFP (engineered Green Fluorescent Protein; Chiu et al. 1996) 유전자에 대한 dsRNAi 벡터를 제조하기 위하여 eGFP의 전체 coding sequence (CDS) 염기서열(720 nt) 중의 일부분(1 ~ 701 nt)을 유전자 특이적 프라이머를 이용하여(Supplementary Table S1), pHANNIBAL 벡터에 도입할 Forward arm (F arm) 및 Reverse arm (R arm) 절편을 PCR로 증폭하였다. 증폭된 F arm과 R arm 절편을 pHANNIBAL 벡터 *Xho* I / *Eco* R I (F arm) 및 *Hind* III / *Bam* H I (R arm) 제한효소 자리에 각각 클로닝한 후, 35S::dsRNAi_eGFP 발현 카세트를 식물 형질전환용 pCambia1300 벡터에 최종 클로닝하였다(Fig. 1A). 제조한 35S::dsRNAi_eGFP 벡터를 electroporation 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404)에 도입하여 벼 형질전환에 사용하였다(Weigel and Glazebrook 2006).

35S::dsRNAi_eGFP 발현 형질전환 벼 제작을 위한 모본으로 낙동벼를 사용하였고, 낙동벼 종자로부터 유기한 embryogenic callus와 35S::dsRNAi_eGFP를 도입한 LBA4404를 공동 배양하여 형질전환 시켰다(Nishimura et al. 2006). 선발마커인 Hygromycin B (50 mg/l)에 대한 저항성 및 RT-PCR을 이용하여 eGFP에 대한 dsRNA발현이 높은 20 계통의 T0 형질전환 벼를 최종 선발하였다. 선발된 T0 식물체를 포장에서 재배하여 T1, T2 종자를 각각 확보하였고, Hygromycin B에 대한 저항성 및 감수성 개체의 분리비 분석을 통하여 최종적으로 4개의 single-copy homozygote T3 계통(#4, #12, #14, #16)을 최종 선발하여 실험에 사용하였다.

RNA 추출 및 mRNA 발현 분석

일반포장 및 식물생육장에서 재배한 낙동벼(wild-type, WT) 및 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼에서 전체 RNA를 추출하기 위하여 재식 후 60일이 지난 식물체의 잎과 뿌리 조직을 액체질소를 이용하여 균질화하였고, LiCl가 첨가된 RNA extraction buffer를 이용하여 보고된 방법에 따라 RNA를 추출하였다(Das et al. 2013). RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)를 사용하여 각 조직에서 추출한 전체 RNA 500 ng을 이용하여 cDNA를 합성하였다.

WT 및 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼에서 유전자발현을 분석하기 위하여 각 유전자 특이적 프라이머를 이용하여(Supplementary Table S1) RT-PCR 및 quantitative real-time (qRT)-PCR을 수행하였다. 먼저, RT-PCR을 위해서 cDNA 1 µl (200 ng), sense 및 antisense 프라이머 각 1 µl (10 pmol), PrimeStar HS DNA polymerase 1 µl (Takara Bio Inc., Shiga, Japan), 5 x PCR buffer 4 µl, 2.5 mM dNTP 2 µl, dH₂O 10 µl를 넣어 총 20 µl로 구성하였으며, 94°C에서 2분간 pre-denaturation

후 94°C에서 30초간 denaturation, 62°C에서 30 초간 annealing, 72°C에서 1분간 elongation 하는 과정을 33 cycles 조건으로 수행하였다. RT-PCR의 결과를 정량적으로 검증하기 위한 qRT-PCR은 CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)을 이용하여 수행되었다 (Baek et al. 2016). 먼저, cDNA 1 µl (200 ng), sense 및 antisense 프라이머 각 0.4 µl (4 pmol), QuantiSpeed SYBR No-ROX Mix 5 µl (PhileKorea Technology Inc., Daejeon), dH₂O 3.2 µl를 넣어 총 10 µl로 구성 하였으며, 95°C에서 2분간 polymerase activation 및 DNA pre-denaturation을 한 후, 95°C에서 15초간 denaturation, 60°C에서 30초간 annealing 하는 과정을 60 cycles 수행하여 증폭산물의 형광을 실시간으로 측정하였다. Melt curve 분석은 65°C에서 95°C까지 0.5초당 0.5°C씩 증가시키며 수행하였다.

Small RNA 발현 분석

Small RNA 발현 분석을 위하여 small RNA Northern blot 방법을 이용하였다(Rio. 2014). 추출한 전체 RNA 5 µg을 동일한 부피의 formamide와 섞어 70°C에서 15 분간 denaturation 한 후 2 µl의 10 x RNase free loading dye와 8 µl의 RNase-free H₂O를 넣어 총 20 µl의 전기영동 시료를 준비하였다. 준비한 RNA 전기영동 시료를 acrylamide gel (7.5 ml 30% acrylamide/Bis-acrylamide solution, 6.3 g UREA, 1.5 ml 5 x TBE buffer, 125 µl 10% Ammonium persulfate, 7.5 µl TEMED, 1.5 ml dH₂O)에서 3시간 동안 전기영동한 후, EtBr로 staining하여 RNA의 전기영동 상태와 size marker들의 위치를 확인하였다. Small RNA를 Semi-dry Blotter (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ)를 이용하여 400 mA로 1 시간 동안 nylon membrane에 이동 시키고, UV cross-linker (Hoefer Inc., Holliston, MA)를 이용하여 1,200 x 100 µJ/cm² 에너지로 두 번 cross-linking하였다. Membrane의 pre-hybridization은 15 ml의 Church buffer (1.5 ml 10% BSA, 30 µl 0.5 M EDTA, 5.25 ml 20% SDS, 7.5 ml 1 M NaHPO₄, 720 µl dH₂O)를 사용하여 37°C에서 3시간 동안 수행되었다. Probe 합성은 200 ng의 *eGFP* cDNA sense fragment와 50 µCi의 [α -³²P] dCTP를 이용하여 Random primer DNA labeling kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)를 사용하여 수행하였다. 합성된 probe는 PROBER column (iNtRON Biotechnology Inc., Sungnam, Korea)을 사용하여 정제한 후, hybridization buffer에 첨가하고 24 시간 동안 37°C에서 hybridization하였다. Hybridization 후, membrane을 2 x SSC buffer로 37°C에서 10 분간 2번 세척하고, 0.1% SDS가 포함된 2 x SSC buffer로 37°C에서 10분 동안 최종 세척한 후, -80°C에서 15 시간 동안 x-ray film에 노출시켜 small RNA 발현을 확인하였다.

Genomic DNA 추출 및 genomic PCR

WT 및 35S::dsRNAi *eGFP* 형질전환 벼 종자를 그라인더를

이용해 균질화 한 후 Exgene™ Rice SV mini kit (GeneAll Biotechnology Co., Seoul, Korea)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. Genomic PCR을 위해서 genomic DNA 1 µl (200 ng), sense 및 antisense 프라이머 각 1 µl (10 pmol), PrimeStar HS DNA polymerase 1 µl (Takara Bio Inc., Shiga, Japan), 5 x PCR buffer 4 µl, 2.5 mM dNTP 2 µl, dH₂O 10 µl를 넣어 총 20 µl의 mixture를 구성하였으며, 95°C에서 5 분간 pre-denaturation 후 95°C에서 45 초간 denaturation, 69°C에서 15 초간 annealing, 72°C에서 45 초간 elongation하는 과정을 27 cycles 반복하는 조건으로 수행하였다.

벼 근권미생물 분리 및 small RNA 전이 분석

포장 재식 60 일 후, WT 및 35S::dsRNAi *eGFP* 형질전환 벼 T3 계통(#4, #14)들을 뿌리가 상하지 않도록 채집삽을 이용해 적출한 후 미생물에 의해 산화된 뿌리 주변의 적색 토양을 긁어내어 채집하였다. 채집된 토양 100 mg을 튜브에 담아 1 ml의 증류수로 균질화한 후, 12,000 rpm에서 30초 동안 원심분리하여 100 µl의 상층액을 NA 배지(BD bioscience, Sparks, MD)에 도말하였다. 도말한 배지는 37°C 조건에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양시킨 plate에 2 ml의 liquid NA media를 첨가하여 미생물들을 수집한 후 1 분간 12,000 rpm으로 원심분리하여 침전 시켰다. 토양 미생물들로부터 전체 RNA 추출을 위해 150 µl의 Solution I buffer [50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl (pH8.0)]에서 10 분간 상온에서 반응 시키고, 300 µl의 Solution II buffer [1% SDS (w/v), 0.2 N NaOH]를 넣고 다시 상온에서 10분간 반응시킨 후 마지막으로 225 µl의 Solution III buffer [Potassium acetate (pH 5.6)]를 첨가하고 얼음에 10 분간 두어 세포 부산물 및 변성된 DNA를 침전 시켰다. 이 후 4°C 조건에서 12,000 rpm으로 10 분간 원심분리하고, 상층액을 새로운 튜브에 옮겨 동일 부피의 isopropyl alcohol을 넣고 잘 섞은 후 12,000 rpm으로 10 분간 4°C 조건으로 원심분리하여 전체 RNA를 침전 시켰다. 마지막으로 80% RNase-free ethanol로 세척한 후 50 µl의 RNase-free dH₂O에 RNA pellet을 녹였다. 정제된 토양 미생물 전체 RNA 10 µg을 사용하여, small RNA Northern blot 방법으로 small RNA 발현을 분석하였다.

결과 및 고찰

35S::dsRNAi *eGFP* 형질전환 벼 제조 및 small RNA 발현 검증

Small RNA를 발현하는 형질전환 벼의 환경위해성 평가방법을 개발하기 위하여, 벼 내재 유전자들과의 염기서열 유사성이 없는 *eGFP* 유전자에 대한 dsRNAi 벡터를 제작하였다.

Fig. 1 Generation of 35S::dsRNAi_eGFP transgenic rice and verification of siRNA expression. (A) Schematic representation of 35S::dsRNAi_eGFP vector construction. PCR amplified forward and reverse fragments of *eGFP* cDNA were initially subcloned into pHANNIBAL vector, and the dsRNAi expression cassette was finally introduced into pCambia1300 binary vector. (B) Expression of *eGFP* dsRNA in T3 generation of 35S::dsRNAi_eGFP transgenic lines (#4, 12, 14, 16). Total RNA extracted from leaves and roots of 60-day-old WT and 35S::dsRNAi_eGFP transgenic rice plants were used for cDNA synthesis and subsequent RT-PCR. *OsACTIN* was used as quantitative control. (C) Small RNA northern blot analysis. Expression levels of siRNAs were evaluated by small RNA northern blot method in WT and 35S::dsRNAi_eGFP rice plants. rRNA bands visualized by EtBr staining were used as RNA loading control

eGFP 유전자 coding sequence (CDS) 일부(1-701 nt)를 dsRNA cassette 제작 벡터인 pHANNIBAL에 sense 및 antisense 방향으로 각각 클로닝한 후, 식물체 형질전환 벡터인 pCambia1300에 도입하여 최종적으로 35S::dsRNAi_eGFP 벡터를 제조하였다(Fig. 1A). 이 벡터를 *Agrobacterium* (LBA4404)에 도입하여 벼 형질전환에 사용하였다. 낙동벼 종자로부터 유기한 embryogenic callus와 35S::dsRNAi_eGFP를 도입한 LBA4404를 공동배양하여 형질전환 시킨 후 재분화를 통해서 선발마커로 사용한 Hygromycin B에 대한 저항성을 가지는 20 계통의 T0 식물체를 확보하였다. Hygromycin B에 대한 저항성 및 감수성 개체의 분리비 분석을 통하여 최종적으로 4개의 single-copy homozygote T3 계통(#4, #12, #14, #16)을 최종 선발하였다.

최종 선발된 4개의 T3 계통 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼에서 *eGFP* 유전자에 대한 siRNA의 발현을 검증하였다. 먼저, RT-PCR을 이용하여 *eGFP*에 대한 dsRNA 발현을 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼의 잎과 뿌리에서 각각 확인하였다. 대조구인(WT) 낙동벼와는 달리 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼의 잎과 뿌리에서 *eGFP* dsRNA 전사체가 높은 수준으로 발현됨을 확인하였다(Fig. 1B). 또한, 각 조직의 전체 RNA를 이용한 small RNA Northern blot에서도 *eGFP*에 대한 siRNA들이 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼의 잎과 뿌리에서 현저히 높은 수준으로 발현됨을 확인하였다(Fig. 1C). Small RNA Northern blot 실험에서 동일한 양의 RNA를 사용하였음에도 잎에서의 siRNA 발현량이 뿌리에 비해서 높게

나타나는 것으로 보아 사용한 CaMV 35S 프로모터의 활성, 또는 siRNA의 발현 및 가공 효율이 식물체의 조직에 따라 다를 수 있음을 시사하고 있다.

In silico off-target 유전자 예측 프로그램 별 특성 분석

siRNA에 의한 유전자 발현 억제 효율 및 off-target effect 가능성에 대한 예측은 도입된 dsRNA cassette에서 생성 가능한 siRNA들의 종류, 표적 유전자와 siRNA의 염기서열 사이의 상보성, 결합 에너지, 유전자 분해 지점 주변의 이차 구조 형성 가능성과 같은 RNA 간섭 현상의 주요 단계들을 종합적으로 평가하여야 하는 것으로 알려져 있다(Reynolds et al. 2004; Mückstein et al. 2006; Kertesz et al. 2007). 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼에서 생성 가능한 siRNA들의 종류와 이 siRNA들에 의한 off-target effect 가능성을 예측하기 위한 최적의 방법을 조사하기 위하여, 현재까지 이와 관련되어 개발된 5종의 웹 기반 프로그램들의 특징을 비교분석 하였다(Table 1). 현재까지 보고된 분석 프로그램들은 miRNA와 siRNA를 대상으로 하며, small RNA의 종류에 관계없이 공통적으로 다음 과정에 따라 분석함을 확인하였다; 1) 표적 유전자 전체 및 특정 염기서열 입력 후 식물체 계통 정보 선택, 2) 입력한 염기 서열에서 발생 가능한 모든 small RNA 염기서열 추출, 3) 염기서열 분석(sequence alignment) 기술을 응용하여 연속 또는 비 연속적으로 일정 염기서열 이상 상보성을 가진 계통 내 small RNA 결합 가능 유전자 추출, 4) small RNA

Table 1 Available web tools for plant small RNA-related *in silico* analysis

Small RNA species	Name(URL)	Applications	Remarks	Reference
miRNA	WMD3 (http://wmd3.weigelworld.org)	<ul style="list-style-type: none"> Artificial miRNA design Off-target searching Target site prediction 	<ul style="list-style-type: none"> >400 genomes and ESTs from >30 plant species. Can select a group of amiRNAs from target gene fragment and design oligoes for amiRNA vector construction using the provided analyze tool, ‘Designer’ and ‘Oligo’. Can minimize the off-target effect and maximize the gene silencing effect by re-analysis of selected amiRNA candidates using the ‘Target search’ tool. Provide ‘BLAST’ and ‘Hybridization’ tool for identification of off-target gene and calculation of hybridization energy. 	Ossowski et al. (2008)
	TAPIR (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/tapir/)	<ul style="list-style-type: none"> Target region prediction of known or unknown miRNA in plant genome miRNA target mimics prediction 	<ul style="list-style-type: none"> 10 genomes from 10 plant species. Can use two different search tools, ‘Fast’ and ‘Precise’, using FASTA and RNA hybrid search engine, respectively. Need to submit miRNA and target gene mRNA sequence for target site searching. Provide pre-computed results of target genes as reference. External DB-link providing detailed target gene information. 	Bonnet et al. (2010)
	psRNATarget (http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/)	<ul style="list-style-type: none"> Off-target gene prediction Target site prediction miRNA candidate searching Gene silencing mechanism determination 	<ul style="list-style-type: none"> >200 genomes from >40 plant species. Can submit miRNA or mRNA sequence as query depending on the purpose of prediction, simultaneous submit also possible when specific miRNAs are suspicious to silence specific genes. Provide useful information such as alignment, target description, inhibition manner, and multiplicity. 	Dai et al. (2011)
siRNA	dsCheck (http://dscheck.rnai.jp/)	<ul style="list-style-type: none"> Off-target minimized dsRNA design Off-target searching 	<ul style="list-style-type: none"> Arabidopsis and rice genomes. Individual counting of 19 nt siRNA hits to all genes of selected DB with number of mismatches. Sequential hit counting makes it possible for users to select off-target minimized dsRNA target sites ranging from 100 bp to 600 bp. 	Naito et al. (2005)
	pssRNAit (http://plantgrn.noble.org/pssRNAit/)	<ul style="list-style-type: none"> Searching of highly effective and functional siRNA Selection of dsRNA target gene fragment for off-target minimized dsRNA design Off-target searching 	<ul style="list-style-type: none"> >140 genomes of 81 plants and some of fungal species. Integration of siRNA efficiency calculation, RISC binding affinity score and BLAST based off-target filtering function. Users can select most desirable target fragment by elimination of low functional siRNA occurring regions and high functional siRNA occurring regions that have more off-target candidates. Providing some valuable information including off-target gene identity, binding region, and various efficacy scores through external link. 	Xu et al. (2006)

에 의한 유전자 발현 억제 현상에서 각 단계별로 요구되는 열 역학적 에너지 값 산출 후 목표 유전자의 발현을 억제하는 최적의 small RNA 선정. Table 1에서는 위에서 언급한 5가지 주요 분석 프로그램들의 특성을 small RNA 종류(miRNA와 siRNA)에 따라 구분하여 나타내었다. 먼저, WMD3 프로그램은 모델 식물인 애기장대와 주요 작물(벼, 콩, 보리, 옥수수 등)들의 다양한 게놈 정보를 이용하여 최적의 artificial miRNA 선정 및 이에 대한 off-target 유전자를 검색할 수 있고, 식물 형질전환용 벡터 제작 방법도 제공한다. psRNATarget 프로그램은 발현 억제 특성이 mRNA 분해(cleavage)를 통해서 인지, 번역억제(translation inhibition)인지를 분석할 수 있는 유일한 프로그램이다. pssRNAit 프로그램은 가장 많은 식

수수 등)들의 다양한 게놈 정보를 이용하여 최적의 artificial miRNA 선정 및 이에 대한 off-target 유전자를 검색할 수 있고, 식물 형질전환용 벡터 제작 방법도 제공한다. psRNATarget 프로그램은 발현 억제 특성이 mRNA 분해(cleavage)를 통해서 인지, 번역억제(translation inhibition)인지를 분석할 수 있는 유일한 프로그램이다. pssRNAit 프로그램은 가장 많은 식

물 중(81종)의 게놈정보를 대상으로 분석할 수 있으며, off-target 유전자 및 이를 표적으로 하는 siRNA들의 염기서열과 억제효율에 관한 정량값들을 제공한다. 본 연구에서는 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼에서 생성 가능한 siRNA들의 종류와 이 siRNA들에 의한 off-target 유전자들의 예측을 위해서 pssRNAit 프로그램을 이용하였다. Table 1에서 정리한 주요 분석 프로그램들의 특성은 식물에서 small RNA를 이용한 연구의 목적에 따라 최적의 프로그램을 선정하는데 유용한 정보를 제공할 수 있을 것이다.

35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼에서 siRNA 생성 및 off-target 유전자 예측

pssRNAit 프로그램을 이용하여 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼에서 발현된 eGFP dsRNA로부터 생성 가능한 siRNAs를 예측하고, 생성된 siRNA들에 의한 off-target 유전자들을 예측하였다(Fig. 2). 먼저, pssRNAit 프로그램의 염기서열 입력창에 벡터 제작에 사용된 eGFP 유전자의 염기서열(1-701 nt)을 입력하고, 분석할 식물의 게놈정보를 벼로 설정한 후 프로그램을 실행하여, 입력한 eGFP CDS 염기서열로부터 발생 가능한 siRNA들의 종류와 함께 이 siRNA들이 결합할 수 있는 벼 내재 유전자들(off-target 유전자)에 대한 정보(Locus ID, Expectation (E) 값, Unpaired Energy (UPE) 값, siRNA와 off-target 유전자와의 염기서열 alignment 결과)를 추출하였다. E 값은 $0 \leq E \leq 5.0$ 의 범위를 가지며, 그 값이 낮을수록 siRNA와 off-target 유전자의 염기서열이 상보성이 높아 off-target 가능성이 높음을 의미한다. UPE 값은 $0 \leq UPE \leq 25.0$ 의 범위를 가지며 off-target 유전자의 염기서열 중 siRNA와 상보적인 부분 및 그 주변에서 형성되는 이차구조를 풀기 위해 필요한 에너지를 의미하고, 이 값이 낮을수록 off-target 유전자일 가능성이 높다. 예측된 off-target 유전자들에 대한 신뢰도를 높이기 위해 위의 과정을 3회 반복하여 공통적으로 예측된 33개의 siRNA들과 726개의 off-target 후보 유전자들을 선발하였다. 선발된 726개의 후보 유전자들 중에서, 33개의 서로 다른 siRNA에 대한 off-target 유전자로 2회 이상 중복 예측(Overlapping ≥ 2)되어 off-target 후보 유전자로서의 가능성이 높은 416개 유전자를 다시 선발하였다. 다음으로, off-target 유전자로서의 가능성이 높은 후보 유전자들을 선발하기 위하여 4.0 이하의 ($0 \leq E \leq 4.0$) E 값을 가지는 유전자들을 먼저 선발한 후, UPE 값이 낮고 높은 중복성(Overlapping ≥ 2)을 나타내는 off-target 유전자들을 우선적으로 선발하였다. 결과적으로, pssRNAit 프로그램을 이용한 *in silico* 분석방법을 통해서 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼에서 그 발현이 비특이적으로 감소할 가능성이 높은 31개의 off-target 유전자들을 최종 선발하였다.

pssRNAit 분석 프로그램은 많은 종류의 게놈 데이터베이스 유전체 정보들을 기반으로 분석하기 때문에, 최종 선발

된 off-target 후보 유전자들의 locus ID 형태가 일정하지 않은 경향을 보였다. 따라서, pssRNAit에서 선발된 31개의 off-target 유전자들의 cDNA 염기서열들을 Rice Genome Annotation Program (RGAP, <http://rice.plantbiology.msu.edu/>)의 BlastN 분석을 통하여 locus ID 형식을 일치 시키고, 선발된 유전자들의 기능을 정리하였다(Fig. 2, Table 2).

In silico 분석을 통해 예측된 off-target 유전자 검증

In silico 분석을 통해 최종 선발된 31종의 off-target 유전자들을 검증하기 위하여 WT과 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼에서 이들 유전자들의 발현을 비교 분석하였다. 예측된 off-target 유전자들의 mRNA 서열 중에서, 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼에서 생성된 siRNAs 결합지점의 상위부분(upstream region)과 하위부분(downstream region)에 각각 결합하는 유전자 특이적 프라이머를 제작하고(Supplementary Table S1), 포장 재식 후 60일 된 WT 및 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼(T3 계통 #4, #14)의 잎에서 추출한 전체 RNA로부터 cDNA를 합성하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 전체 31종의 off-target 유전자들 중에서 9개 유전자들의 발현이 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼에서 특이적으로 감소되어 있음을 확인하였다(Fig. 3A). 나머지 22개의 유전자들 중에서 8개의 유전자들은 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼에서 특이적인 발현 감소 양상을 보이지 않았으며(Fig. 3B), 특히 14개의 유전자들은 WT과 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼에서 발현이 관찰되지 않았으며(data not shown), 이 유전자들의 발현은 잎에서 매우 낮거나, 특정한 조직이나 시기, 혹은 특정 환경 조건에서 발현될 가능성이 있다. 본 RT-PCR 결과는, WT 벼에 비해서 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼에서 특이적으로 발현이 감소한 9개 유전자들이 형질전환 벼에서 발현된 siRNA들에 의한 실질적 off-target 유전자일 가능성을 나타내고 있다. RT-PCR 결과를 검증하고, 이들 유전자의 발현 감소를 정량적으로 분석하기 위하여 qRT-PCR을 수행하였다. 이를 위하여 환경적인 요인이 최소화된 조건인 식물 생육장에서 60일 동안 재배한 WT과 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼의 잎에서 유전자 발현을 조사하였다. 그 결과, RT-PCR의 결과와 유사한 경향의 발현 감소가 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼 계통들에서 확인되었다(Fig. 4). 특히, 9개 유전자들 중에서 6개 유전자들의 발현은 통계적으로 유의한 수준으로 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼 계통들에서 감소되었다. 이러한 결과는, *in silico* 분석 기법을 이용해 예측한 31개의 off-target 후보 유전자들 중에서 적어도 6개의 유전자들은 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼에서 발현된 siRNA들에 의한 실질적 off-target 유전자임을 나타내고 있다. 또한, 이 결과는 본 연구에서 이용한 *in silico* 분석 기법이 small RNA, 특히 siRNA를 발현하는 dsRNAi 형질전환 식물체의 off-target 유전자들을 예측하는데 효과적으로 이용될 수 있음을 시사하고 있다.

Fig. 2 Flowchart depicting *in silico* prediction of off-target genes of 35S::dsRNAi_eGFP transgenic rice. Off-target candidates were predicted by using the pssRNAit program (<http://plantgrn.noble.org/pssRNAit/>) and the predicted genes were identified by BLAST analysis using the Rice Genome Annotation Project (RGAP, <http://rice.plantbiology.msu.edu/>)

35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼의 non-target effect 검증

RNAi 형질전환 식물체에서 발현된 siRNA들은 곤충이나 곰팡이 또는 근권 미생물 등으로 전이(수평 이동)되어 이들의 유전자발현에 영향을 미치거나, 또는 이들을 매개체로하여 주변의 식물 등으로 전이(수직 이동)되어 유전자발현을 교란하는 환경적 위해성을 가질 수 있으며, 이러한 현상을 non-target effect라 한다(Auer and Frederick 2009; Ramesh 2013). 본

실험에서는 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼에 의해서 나타날 수 있는 non-target effect를 검증하기 위한 실험적 방법을 개발하고자 하였다. 먼저, 각 9개씩의 subplot으로 구성된 시험구 3개(Plot 1, 2, 3)를 제작하고, 각 subplot 당 25개체씩의 벼 식물체를 30 cm x 20 cm 간격으로 식재하였다. 각 시험구의 중앙에 위치한 subplot에는 음성대조구인 WT 벼(Plot 1)와 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼 T3 계통 #4 (Plot 2) 및 #14 (Plot 3) 식물체를 각각 식재하였고 그 주변의 subplot들에는

Table 2 *In silico* predicted off-target candidates of 35S::dsRNAi_ *eGFP* transgenic rice

Gene Name	Functional siRNA ¹	E ²	UPE ³	Description
<i>LOC_Os01g05960</i>	UGCUGCUUCAUGUGGUCGGGG	3.5	9.3	Receptor kinase
<i>LOC_Os01g27600</i>	UGCUGCUUCAUGUGGUCGGGG	2	18.1	Uncharacterized
<i>LOC_Os01g45410</i>	UUCACCAGGGUGUCGCCUCG	2	16.8	Uncharacterized
<i>LOC_Os01g58240</i>	UGUGGCCGUUUACGUCGCCGU	2.5	21.7	OsSub6
<i>LOC_Os01g58270</i>	UGUGGCCGUUUACGUCGCCGU	2	20.0	OsSub7
<i>LOC_Os01g62945</i>	UGUGGCCGUUUACGUCGCCGU	2	21.1	Unknown
<i>LOC_Os01g73720</i>	UCGGCGAGCUGCACGCGCCG	2.5	22.9	RCLEA4
<i>LOC_Os02g26160</i>	AGCAGCACGGGGCCGUCGCCG	4	12.2	Lectin receptor kinase
<i>LOC_Os02g57700</i>	AGCUGCACGCGCCGUCCUCG	3.5	18.3	Receptor kinase
<i>LOC_Os03g12570</i>	UGCACGCGCCGUCCUCGAUG	3	17.8	OsCMT1
<i>LOC_Os03g12790</i>	UGUGGCCGUUUACGUCGCCGU	3	17.1	MATE family protein
<i>LOC_Os03g38610</i>	UGCGCUCCUGGACGUAGCCUU	2.5	20.4	OsMADS87
<i>LOC_Os04g52630</i>	AAGCACUGCACGCCGUAGGUG	3.5	16.5	Receptor kinase
<i>LOC_Os04g54930</i>	UGUGGCCGUUUACGUCGCCGU	4	16.8	ATP-binding cassette transporter
<i>LOC_Os04g56930</i>	CUCGAACUUCACCUCGGCGCG	3	23.4	Glycosyl hydrolase
<i>LOC_Os05g34800</i>	UGUGGCCGUUUACGUCGCCGU	3	22.3	Uncharacterized
<i>LOC_Os06g05230</i>	CUCGAACUUCACCUCGGCGCG	3	22.0	Retrotransposon protein
<i>LOC_Os06g39530</i>	AGCUGCACGCGCCGUCCUCG	3	18.0	Uncharacterized
<i>LOC_Os06g42610</i>	UCGAACUUCACCUCGGCGCGG	3.5	19.1	Cytochrome P450 protein
<i>LOC_Os07g10110</i>	UCGGCGAGCUGCACGCGCCG	1.5	23.9	Uncharacterized
<i>LOC_Os09g10760</i>	UCGAACUUCACCUCGGCGCGG	3	20.8	RRM protein
<i>LOC_Os09g34930</i>	AGCUGCACGCGCCGUCCUCG	3	23.6	3-ketoacyl-CoA synthase
<i>LOC_Os09g35600</i>	GAAGCACUGCACGCCGUAGGU	3	8.9	MATE domain protein
<i>LOC_Os10g23830</i>	AGCUGCACGCGCCGUCCUCG	3	22.3	PPR repeat domain protein
<i>LOC_Os10g26750</i>	CAGCACGGGGCCGUCGCCGAU	2	23.7	Uncharacterized
<i>LOC_Os11g35200</i>	CUCGAACUUCACCUCGGCGCG	3	19.4	Retrotransposon protein
<i>LOC_Os11g41710</i>	GAGCUGCACGCGCCGUCCUC	3.5	20.2	Cytochrome P450 protein
<i>LOC_Os11g47350</i>	GACACGUGAACUUGUGGCCG	3	17.9	Beta-D-xylosidase
<i>LOC_Os12g01910</i>	ACGUAGCCUUCGGGCAUGGCG	1.5	21.7	Pentatricopeptide repeat protein
<i>LOC_Os12g27070</i>	UCGGCGAGCUGCACGCGCCG	2	24.8	DnaJ protein
<i>LOC_Os12g38090</i>	AGCAGCACGGGGCCGUCGCCG	1.5	24.5	OsFBX456

¹Putative siRNA that can be effective in silencing of mRNAs of target and off-target.

²Expection (E): The value of complementarity between functional siRNA and off-target transcript. Cut-off range is 0–5.

³Unpaired Energy (UPE): The energy required to open a secondary structure around a target site of mRNA. Cut-off range is 0 to 25.

WT 벼를 식재하여, 중앙에 위치한 형질전환 벼에서 생성된 siRNA들이 주변의 WT 벼 및 근권미생물로 전이되는지 여부를 조사하였다(Fig. 5). 먼저, 곤충 및 근권 미생물 등을 매개로 하여 주변 WT 벼로 siRNA의 전이를 조사하기 위하여 35S::dsRNAi_ *eGFP* 형질전환 벼로부터 30, 60, 90, 120 cm 거리에 식재된 WT 벼의 잎과 뿌리를 각각 채취하였다(Fig. 5). 채취한 잎과 뿌리에서 전체 RNA를 추출하고 RT-PCR을 통해 *eGFP* dsRNA의 전사체 존재 여부를 검증 하였으며, small RNA Northern blot을 이용하여 siRNA 존재를 조사하였다. 그

결과, 35S::dsRNAi_ *eGFP* 형질전환 벼 식물체(#4, #14)를 제외한 주변의 모든 WT 벼의 잎과 뿌리에서 *eGFP* dsRNA (Fig. 6A) 및 *eGFP* siRNA가 검출되지 않았다(Fig. 6B).

다음으로, 35S::dsRNAi_ *eGFP* 형질전환 벼에 도입된 T-DNA가 꽃가루를 통해 주변의 WT 벼로의 이동 여부를 확인하였다. 35S::dsRNAi_ *eGFP* 형질전환 벼로부터 30, 60, 90, 120 cm 거리에 식재된 WT 벼에서 종자를 각각 수확하여 genomic DNA를 추출하였고, *eGFP* 유전자 특이적 프라이머를(Supplementary Table S1) 이용하여 genomic PCR을 수행하였다. 그

Fig. 3 Expression patterns of predicted off-target candidates in 35S::dsRNAi_eGFP transgenic rice. (A, B) Off-target candidate genes specifically suppressed in 35S::dsRNAi_eGFP plants (A) showed no specific suppression in 35S::dsRNAi_eGFP plants (B). RT-PCR was conducted by using total RNA extracted from the leaves of 60-day-old T3 homozygote lines (#4, #14) of 35S::dsRNAi_eGFP and WT plants. *OsACTIN* was used as quantitative control

Fig. 4 Quantitative analysis of transcript levels of selected off-target genes using qRT-PCR. Relative expression levels of selected nine off-target genes in 35S::dsRNAi_eGFP plants were determined by comparing with those in WT plant. The expression levels were normalized to the expression of *OsACTIN*. Error bars represent the means $\pm$ standard deviations of two independent replicates. Asterisks indicate significant differences from the WT (*; p -value <0.05 , Student's t -test)

Fig. 5 Schematic representation of experimental design for the test of non-target effects of 35S::dsRNAi_eGFP rice. (A) Experimental plot composition. Each experimental plot was composed by nine subplots and each subplot had 25 plants of WT or transgenic lines. All plants in subplots were planted 30 cm x 20 cm intervals. Eight WT subplots were arranged in all directions of the transgenic subplot to detect the putative transfer of T-DNA or siRNAs from 35S::dsRNAi_eGFP transgenic plants. In Plot 2 and Plot 3, 35S::dsRNAi_eGFP transgenic lines (#4, #14) were used as generator, respectively. Plot 1 with WT generator was used as a negative control. WT plants, planted at 30, 60, 90, and 120 cm distance from 35S::dsRNAi_eGFP transgenic plants were sampled to test T-DNA or siRNAs transfer, respectively

결과, 형질전환체 주변의 WT 벼로부터 수확된 WT 벼 종자에서는 *eGFP* 유전자가 검출되지 않았으며, 이 결과는 꽃가루를 통한 유전자의 이동이 일어나지 않았음을 나타낸다 (Fig. 6C).

마지막으로, 근권미생물로의 *eGFP* siRNA들의 이동 여부를 검증하기 위하여, 대조구 식물체(Plot 1) 및 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼 계통 #4 (Plot 2), #14 (Plot 3)에서 30 cm 거리에 식재된 WT 벼의 근권 토양을 각각 채집하였다. 근권 토양에 흡착된 미생물들은 개체수가 적으므로 이로부터 직접 전체 RNA를 추출하기 어렵다. 따라서, 근권 토양으로부터 분리한 미생물들을 NA 배지에 배양하여 증식한 후(Fig. 6D), 이로

부터 전체 RNA를 추출하여 small RNA Northern blot을 수행하였다. 그 결과, 대조구를 포함한 모든 시험구에서(Plot 1, 2, 3) 채취한 근권 미생물에서 *eGFP* 유전자에 대한 siRNA들이 검출되지 않았다(Fig. 6E). 이상의 결과들을 종합해 볼 때, 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벼에서 발현된 siRNA들의 주변 생태계로의 이동(non-target effect)은 일어나지 않았음을 확인하였다. 하지만, 생태계로 유출된 siRNA의 양이 본 연구에서 사용한 small RNA Northern blot 방법의 검출한계 이하로 적을 가능성을 완전히 배제하기는 어려운 것으로 사료된다.

Fig. 6 Verification of non-target effects of 35S::dsRNAi_eGFP plants. (A, B) Detection of transfer of *eGFP* dsRNA (A) and its derivative siRNAs (B) from 35S::dsRNAi_eGFP plants to neighboring WT plants by using RT-PCR and small RNA northern blot, respectively. Total RNA was extracted from leaf and root tissues of 60-day-old rice plants and used for experiments. *OsACTIN* and rRNA bands visualized by EtBr staining were used as control for RT-PCR and small RNA northern blot, respectively. (C) Genomic PCR analysis. Genomic DNA was extracted from the seeds of WT and 35S::dsRNAi_eGFP transgenic plants (TR). (D, E) Detection of siRNAs transfer into rhizosphere microorganisms from 35S::dsRNAi_eGFP plants. Rhizosphere microorganisms attached on root-associated oxidized soil were suspended in distilled water and cultured on NA-agar media (D). The existence of siRNAs in rhizosphere microorganisms was tested by small RNA northern blot (E). Total RNA extracted from roots of 35S::dsRNAi_eGFP plants was used as positive control (PC)

결론

현재, 생명공학 작물 개발에 있어서 그 이용이 점차 증가하고 있는 dsRNAi 시스템을 보다 안전하고 효과적으로 이용하기 위해서는 잠재적 환경위해성에 대한 정확한 예측 및 검증 기술이 필요하다. 본 연구에서는 RNAi 벡터 형질전환체를 이용하여, 이 형질전환체가 가질 수 있는 환경위해성(off-target effect 및 non-target effect)을 예측하고, 이를 검증할 수 있는 방법을 개발하였다. 먼저, off-target 유전자의 예측을 위해서는, 웹 기반 프로그램인 pssRNAit를 이용하여 도입한 유전자에서 생성 가능한 siRNA들을 예측하고, 이들의 유전자 다중성(overlapping) 및 정량지표(E 값 및 UPE 값)를 복합적으로 고려하여 off-target 후보유전자를 선별하고 최종적으로 RT-PCR 및 qRT-PCR을 이용하여 이들의 발현을 분석하는 것이 효과적인 방법임을 확인하였다. 또한, 유전물질의 이동을 통한

non-target effect 검증을 위해 35S::dsRNAi_eGFP 형질전환 벡터로부터 주변의 벡 식물체 및 근권 미생물로의 siRNA의 이동 여부 및 꽃가루를 통한 도입 DNA의 이동 여부를 검증하기 위한 방법을 제시하였다. 본 연구에서 개발한 방법들은 small non-coding RNA를 발현하는 생명공학작물들이 가질 수 있는 잠재적 환경위해성을 예측하고 검증하는데 있어 그 활용 가치가 클 것으로 사료된다.

사사

본 논문은 농촌진흥청 지정 LMO 환경위해성평가기관 연구 과제(경상대학교 기관고유 기술보고서, PJ0143022019) 지원으로 수행한 결과임.

References

- Auer C, Frederick R (2009) Crop improvement using small RNAs: applications and predictive ecological risk assessments. *Trends in Biotechnology* 27:644–651
- Axtell MJ (2013) Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annual Review of Plant Biology* 64:137–159
- Baek DW, Chun HJ, Kang SH, Shin GO, Park SJ, Hong HW, Kim CM, Kim DH, Lee SY, Kim MC, Yun DJ (2016) A Role for Arabidopsis miR399f in Salt, Drought, and ABA Signaling. *Molecules and Cells* 39: 111–118
- Bonnet E, He Y, Billiau K, Van de Peer Y (2010) TAPIR, a web server for the prediction of plant microRNA targets, including target mimics. *Bioinformatics* 26:1566–1568
- Chiu W, Niwa Y, Zeng W, Hirano T, Kobayashi H, Sheen J (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology* 6:325–330
- Dai X, Zhao PX (2011) psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Research* 39:155–159
- Das A, Saha D, Mondal TK (2013) An optimized method for extraction of RNA from tea roots for functional genomics analysis. *Indian Journal of Biotechnology* 12:129–132
- He L, Hannon GJ (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics* 5:522–531
- Kamthan A, Chaudhuri A, Kamthan M, Datta A (2015) Small RNAs in plants: recent development and application for crop improvement. *Frontiers in Plant Science* 6:208
- Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E (2007) The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nature Genetics* 39:1278–1284
- Melnik CW, Molnar A, Baulcombe DC (2011) Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO Journal* 30:3553–3563
- Mückstein U, Tafer H, Hackermüller J, Bernhart SH, Stadler PF, Hofacker IL (2006) Thermodynamics of RNA–RNA binding. *Bioinformatics* 22:1177–1182
- Naito Y, Yamada T, Matsumiya T, Ui-Tei K, Saigo K, Morishita S (2005) dsCheck: highly sensitive off-target search software for double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Nucleic Acids Research* 33:589–591
- Nishimura A, Aichi I, Matsuoka M (2006) A protocol for Agrobacterium-mediated transformation in rice. *Nature Protocols* 1:2796–2802
- Ossowski S, Schwab R, Weigel D (2008) Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *Plant Journal* 53:674–690
- Ramesh SV (2013) Non-coding RNAs in crop genetic modification: considerations and predictable environmental risk assessments (ERA). *Molecular Biotechnology* 55:87–100
- Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology* 22:326–330
- Rio DC (2014) Northern blots for small RNAs and microRNAs. *Cold Spring Harbor Protocols* 7:793–797
- Sen GL, Blau HM (2006) A brief history of RNAi: the silence of the genes. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 20:1293–1299
- Simon SA, Meyers BC (2011) Small RNA-mediated epigenetic modifications in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 14:148–155
- Weigel D, Glazebrook J (2006) Transformation of agrobacterium using electroporation. *Cold Spring Harbor Protocols* 7:1–13
- Xu P, Zhang Y, Kang L, Roossinck MJ, Mysore KS (2006) Computational estimation and experimental verification of off-target silencing during posttranscriptional gene silencing in plants. *Plant Physiology* 142:429–440
- Zhang T, Jin Y, Zhao JH, Gao F, Zhou BJ, Fang YY, Guo HS (2016) Host-Induced Gene Silencing of the Target Gene in Fungal Cells Confers Effective Resistance to the Cotton Wilt Disease Pathogen *Verticillium dahlia*. *Molecular Plant* 9: 939–942
- Zhu L, Zhu J, Liu Z, Wang Z, Zhou C, Wang H (2017) Host-Induced Gene Silencing of Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae* Pathogenicity Genes Mediated by the Brome Mosaic Virus. *Genes* 8:241