

RNA 沉默—新型的植物病毒病害防治策略*

牛颜冰 郭失迷 宋艳波 雷万钧 申林炎

(山西农业大学 太谷 030801)

摘要 植物 RNA 沉默(RNA silencing)是植物本身固有的一种抗病毒防御系统,是对病毒在复制过程中形成双链 RNA(dsRNA)的特殊反应。RNA 沉默介导的 dsRNA 干涉病毒侵染转基因抗病毒有其不足,几种体外生产 dsRNA 的抗病毒体系能弥补这一不足,它们与转基因表达病原 RNA 不同,但仍然依赖 RNA 沉默机制来获取病原抗性。综述了近年来发展起来的各种启动 RNA 沉默的 dsRNA 产生策略、抗病状况和存在的问题及发展前景。

关键词 RNA 沉默 双链 RNA 抗病毒

RNA silencing—a new strategy for the control of virus diseases in plants. NIU Yan-Bing, GUO Shi-Mi, SONG Yan-Bo, LEI Wan-Jun, SHEN Lin-Yan (Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China), *CJEA*, 2005, 13(2): 47~50

Abstract RNA silencing occurs in plants is conceived as a natural antiviral defense system that is activated as a response to double-stranded RNA (dsRNA) formed during virus replication. To compensate for the disadvantages on RNA silencing by using dsRNA to specifically interfere with virus infection in transgenic plants, several approaches of obtaining dsRNA used for virus-resistance have been developed which differ from strategies based on transgenic expression of RNAs but still rely on RNA silencing as a means to achieve pathogen-derived resistance (PDR). In this paper, the dsRNA produce strategies for RNA silencing, their applications for virus resistance, disadvantages and perspectives are reviewed.

Key words RNA silencing, Double-stranded RNA, Virus resistance

(Received Aug. 16, 2004; revised Aug. 31, 2004)

RNA 沉默是真核生物共有的、在转录后水平起作用的同源依赖的基因沉默现象^[3],双链 RNA(dsRNA)高效启动 RNA 沉默后,被 Dicer (RNA 酶 III 样的核酸酶)切割成 21~26nt 的小的干扰型 RNA(siRNAs),随后 siRNAs 整合入 RNA 诱导的沉默复合物(RISC),并引导 RISC 对与其同源的目标 RNA 进行降解^[1]。植物抗病毒过程是 RNA 沉默介导的病毒 RNA 与所转病毒基因的 mRNA 均被降解的过程^[4]。Fire A. 等^[5]发现向小杆线虫投递外源 dsRNA 能导致小杆线虫相应内源基因以序列特异性的行为降解,这一发现开创了人类利用外源 dsRNA 沉默基因、抗病毒的新局面。随后有研究发现 dsRNA 或体内能转录出自我互补发夹 RNA(也即 dsRNA)的反向重复片段也是植物基因沉默的高效启动子,含有病原 dsRNA 的转基因植物能以 100% 的效率诱导植物对病毒产生免疫^[6,7]。植物 RNA 病毒的细胞质复制中间体即类似启动植物抗病毒防御机制的 dsRNA,这种 dsRNA 通过启动植物 RNA 沉默机制对植物进行保护^[8]。作为一种反防御策略,许多植物病毒编码在 RNA 沉默不同阶段起抑制作用的蛋白抑制子,植物抗病毒过程是植物对病毒的 RNA 沉默防御过程与病毒对植物的反防御过程的较量。用病原 dsRNAs 转化大麦、烟草、番茄等获得多种抗病毒转基因植物。由于植物病毒的寄主范围一般较广泛,通常能危害多种植物,必须将同一病原 dsRNAs 转入多种寄主植物才能获得多种抗病毒转基因植物。故植物病毒学家目前共同研究目标是将动物中所用的外源 dsRNA 沉默基因方法延伸到植物抗病毒中,以期发展一种新的以 RNA 沉默为基础,但又有别于通过转基因表达 RNA 的新型抗病毒策略。

1 植物中的 RNA 沉默抗病毒

RNA 沉默的本质是将 RNA 沉默诱导因子 dsRNA 投递至生物体的组织或细胞引起生物体中同源目标 RNA 的降解。RNA 沉默介导的抗病毒策略是将病原 dsRNA 投递至植物叶片引起病原 dsRNA 和同源病毒 mRNA 的降解。

* 山西农业大学优秀人才引进基金项目 and 山西农业大学博士启动基金项目

收稿日期:2004-08-16 改回日期:2004-08-31

1.1 转基因植物中转基因转录产生的病原 dsRNA 分子抗病毒

dsRNA 能被表达自我互补发夹 RNA 的转基因传递,其原因是由于反向重复结构的转录产物自交形成发夹结构,该发夹结构含有单链环区(通常是内含子)和与诱导 RNA 沉默的 dsRNA 结构极其相似的碱基互补臂。Smith N. 等^[6]研究表明,内含子被剪切掉的发夹结构转基因抗病毒能引起转基因植物几乎 100% 发生沉默,导致几乎所有转基因植物对病毒产生免疫作用。Wang M. B. 等^[7]将大麦黄矮病毒 PAV 分离物 (BYDV-PAV) 多聚蛋白基因的反向重复结构转化大麦,在所得 25 株转基因大麦中有 9 株对 BYDV-PAV 具有免疫作用。笔者将番茄花叶病毒移动蛋白基因 (ToMV-MP) 的反向重复结构转化烟草,在所得 47 株转基因烟草中有 23 株对 ToMV 具有免疫作用;将烟草花叶病毒部分复制酶基因 (CMV- ΔRep) 的反向重复结构转化烟草,在所得 40 株转基因烟草中有 25 株对 CMV 具有免疫作用。

1.2 非转基因植物中体外转录出的病原 dsRNA 分子抗病毒

Tenllado F. 等^[9]将 3 种典型正链 RNA 病毒辣椒轻斑驳病毒 (PMMoV)、烟草蚀纹病毒 (TEV) 和苜蓿花叶病毒 (AMV) 基因组不同部位 cDNA 克隆转录成正义单链 RNA (ssRNA) 和反义单链 RNA,并将二者退火形成 dsRNA,将所得病原 dsRNA 和同源病毒摩擦接种植物叶片,考察体外转录出的 dsRNA 能否以序列特异性的行为干涉病毒侵染。首先他们对 PMMoV 的正义 ssRNA、反义 ssRNA 和 dsRNA 抑制其诱导敏感寄主(珊西烟和辣椒)产生局部枯斑情况进行分析,发现机械接种 PMMoV 54kDa 蛋白区域的正义 ssRNA、反义 ssRNA 均不能使 PMMoV 在珊西烟和辣椒上所产生的枯斑数减少,只有与该病毒具有极高序列同源性的 dsRNA 才能对其侵染产生干涉作用。其次他们将 PMMoV 及其 dsRNA 同时接种其系统寄主本氏烟,发现病原 dsRNA 对系统寄主中同源病毒的侵染也具有干涉作用。抗病性分析还表明 PMMoV 的 dsRNA 干涉其系统侵染有长度要求,如 PMMoV 的 596bp 长的 dsRNA 对 PMMoV 系统侵染具有干涉作用,而 PMMoV 的 315bp 长的 dsRNA 则无干涉作用,仅能推迟 1~2d 发病,且病毒 RNA 的量与对照接近。Thomas C. L. 等^[10]也发现含有目标基因 300~800bp 片段的重组病毒能有效诱发植物 RNA 沉默,少数情况下 23~60bp 的片段也能诱导植物 RNA 沉默,这与在植物、小杆线虫和果蝇中所发现的 RNA 沉默依赖于 dsRNA 的长度相一致^[5]。Tenllado F. 等还进一步证明病原 dsRNA 对植物病毒侵染产生干涉是一个普遍的策略,如 TEV HC-Pro 的 dsRNA 对 TEV 具有抗性;AMV RNAs1、AMV RNAs2 和 AMV RNAs3 体外转录产物以及 AMV RNAs3 的 1124bp 的 dsRNA 对 AMV 也具有抗性。上述研究结果表明植物叶片同时接种体外转录出的病原 dsRNA 和目标病毒能引发 RNA 沉默,进而导致植物对病毒侵染产生干涉作用。体外转录出的 dsRNA 通过叶片伤口进入植物细胞,因而无法确保定量的 dsRNA 进入植物细胞,因此很难确定诱导植物 RNA 沉默抗病毒的最适 dsRNA 量。在实验条件下针对 PMMoV, Tenllado F. 等^[9]发现对病毒具有干涉作用的 dsRNA 最低限量是病毒 RNA 的 500 倍,这一结果显然与小杆线虫中几分子的 dsRNA 就足以诱导 RNA 沉默相违背^[5]。有研究推测转基因 RNA 沉默扩增是由于沉默诱导因子 dsRNA 产生的初级 siRNAs 与目标 RNA 退火,通过寄主编码的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RdRp) 引发类似 PCR 的酶促反应形成新 dsRNA 所致。Tenllado F. 等^[9]的研究体系中 dsRNA 对病毒侵染的干涉作用发生在细胞水平,即在敏感寄主中 dsRNA 可干涉 PMMoV 的侵染;在系统寄主中病毒能够部分战胜 dsRNA 所提供的保护作用,导致接种叶片中有效侵染位点减少。该系统中不存在 RNA 沉默扩增是因其体外合成的 dsRNA 无法从目标病毒 RNA 中引发新 dsRNA 产生所致。为引起干涉作用,将病毒和 dsRNA 接入同一植物细胞是必要的,它们之间间隔仅 24h 即可导致植物对病毒完全敏感,这些发现表明植物中局部引入的 dsRNA 不能诱发系统性的抗病毒反应。

1.3 非转基因植物中瞬时表达的病原 dsRNA 分子抗病毒

用农杆菌培养液浸润接种植物组织来瞬时表达基因已成为向植物投递 RNA 沉默诱导因子、目标和抑制子的一种方法^[11]。Tenllado F. 等^[12]首次证实实用含有能转录产生 dsRNA 结构的农杆菌浸润接种非转基因植物叶片,所得病原 dsRNA 对植物病毒侵染具有干涉作用。他们用含有 PMMoV 54kDa 区域 dsRNA 的农杆菌浸润接种本氏烟,该烟草接种叶对随后 PMMoV 的挑战接种产生抗性,相反用农杆菌正向或反向瞬时表达 2 个串连(头尾相连)的 PMMoV 54kDa 区域,该植物接种叶及上部叶片中均有发病症状。农杆菌介导的瞬时表达系统产生的外源 dsRNA 对植物病毒侵染的干涉作用与 RNA 沉默有直接联系, Tenllado F. 等^[12]发现该体系的几个 RNA 沉默特征,一是 dsRNA 对植物病毒侵染所产生的干涉作用依赖于发夹 RNA 与目标 RNA 的序列同源性。将与 PMMoV 不相关的病毒如 AMV 或 TMV 接种瞬时表达 PMMoV dsRNA 的植物时,该植物表现出典型的花叶症状;相反,将与 PMMoV 同源性高达 93% 的病毒 PMMoV-I 接种瞬时

表达 PMMoV dsRNA 的植物时,该植物则表现不发病;而用与 PMMoV 发夹 RNA 同源的马铃薯 X 病毒 (PVX) 重组载体接种含 PMMoV 发夹 RNA 农杆菌浸润接种过的植物后,该植物对相关病毒具有抗性。二是 dsRNA 浸润接种的植物叶片中,也含有 2 种类型能诱发植物发生 RNA 沉默的 siRNAs,它们都是 RNase III 切割 dsRNA 的产物。三是 dsRNA 引发的植物对 PMMoV 的干涉作用,能被李痘病毒 (PPV) HC-Pro 的瞬时表达克服。Brigneti G. 等^[13]发现马铃薯 Y 病毒 (PVY) 的 HC-Pro 是 RNA 沉默的病毒抑制子。目前虽无确凿的证据,但 PPV 的 HC-Pro 可能也是 RNA 沉默的病毒抑制子,其原因是 PPV 的 HC-Pro 参与了与其他病毒中 HC-Pro 的沉默抑制非常相似的本氏烟中 PVX 的共生作用。Tenllado F. 等虽仅提及 PMMoV 的 dsRNA 对相应的病毒侵染具有干涉效果,其实许多植物 RNA 病毒的发夹 RNA 都能通过农杆菌介导法瞬时表达来抑制其同源病毒的侵染。正如笔者等^[2]所研究证实黄瓜花叶病毒 (CMV) 部分复制酶基因的发夹 RNA 和番茄花叶病毒 (ToMV) 全长运动蛋白发夹 RNA 瞬时表达均能干涉其同源病毒的侵染。Ruiz M. T. 等^[14]对植物 RNA 沉默的分析表明, RNA 沉默包括起始、系统性沉默信号的扩增和保持 3 个相互独立的过程。Palauqui J. C. 等^[15]报道与目标 RNA 同源的细胞核因子、转基因或内源基因是 RNA 沉默的系统沉默信号传播和扩增所必需的。笔者研究发现摩擦接种 dsRNA 能启动以降解 RNA 为目标的 RNA 沉默起始,但 RNA 沉默的保持则需要与目标病毒 RNA 同源的细胞核因子、转基因或内源基因。瞬时表达 dsRNA 对植物病毒所产生的干涉效果与向植物叶片中摩擦接种 dsRNA 所产生的干涉效果类似,但这 2 个系统中都缺乏同源的细胞核因子、转基因或内源基因等因子,也不具有持续输入适量外源 dsRNA 的能力,从而导致特定信号分子不能向植物其他部分传递。

2 RNA 沉默控制植物病毒病的潜能

体外转录合成的 dsRNA 和农杆菌介导的瞬时表达系统表达的 dsRNA 用于植物抗病毒时,它们的致命缺陷是这些体系中接种叶片产生的 RNA 沉默不能传递至植物的其他叶片,从而导致体外转录的 dsRNA 或农杆菌介导的瞬时表达系统表达 dsRNA 引发的干涉作用仅局限于基础研究。若能发展一种高效产生和投递足够量 dsRNA 到整株植物的方法,提供外源 dsRNA 将极有可能成为植物抗病毒侵染产业化的最适生物学工具。Timmons L. 等^[16,17]用“HT115”生产的 dsRNA 诱导小杆线虫内源基因发生了 RNA 沉默。“HT115”是缺失 RNase III 的突变体, RNase III 能降解细菌中绝大多数 dsRNA, 故“HT115”菌株能大量生产长的 dsRNA。基于“HT115”菌株这一特性, Tenllado F. 等^[18]用转化 PMMoV 的 54kDa 区域 dsRNA 结构的“HT115”生产了大量病原 dsRNA, 并发现细菌产生的 dsRNA 也能干涉 PMMoV 的侵染。Tenllado F. 等发现混合接种 PMMoV 和“HT115”生产的 PMMoV 的 dsRNA 酚抽提物的烟草, 其接种叶整个生活周期内均不发病, 也无病毒积累; 而混合接种 PMMoV dsRNA 核苷酸提取物和与其非同源的病毒 TMV, PMMoV dsRNA 则对 TMV 无干涉作用; 混合接种 PMMoV 和“HT115”生产的空载体 dsRNA 酚抽提物的烟草却表现发病症状, 说明细菌提取物的非特异性毒性对病毒侵染无影响, 因此细菌表达的 dsRNA 对病毒侵染的干涉作用也依赖于序列同源性。为促使“HT115”生产病原 dsRNA 抗病毒技术产业化应用, Tenllado F. 等^[18]还研究出将病原 dsRNA 粗提取物喷至植物叶面的技术, 他们发现用喷雾器将病原 dsRNA 喷至植物叶面几天后, 再在植物同一叶片机械接种 PMMoV 和 PPV, 该植物对病毒具有免疫作用, 其理论基础是喷在植物叶面的 dsRNA 分子可停留在叶面数天, 并能借助于表皮细胞伤口与病毒粒子一起进入植物细胞, 结果这些 dsRNA 分子被寄主植物的 Dicer 切割成指导同源病毒 RNA 切割的 siRNAs, 随后 siRNAs 整合入 RISC, 并引导 RISC 对与其同源病毒 RNA 进行降解。目前用“HT115”生产的病原 dsRNA 抗病毒还仅局限于少数几种病毒(如 PMMoV 和 PPV) 的实验研究阶段。

3 RNA 沉默抗病毒病应用前景

RNA 沉默是许多真核生物固有的抗病毒策略, dsRNA 分子是所有生物体中 RNA 沉默的高效诱导因子。对已建立起成熟遗传转化体系的作物而言, 依赖 RNA 沉默机制, 用转病毒基因反向重复结构(转录产生 dsRNA) 来获取抗病毒转基因植物是基因工程控制植物病毒病害的最有效方法, 且在所得抗病毒转基因植物中既不存在有功能的病毒基因或蛋白, 也不存在转基因 mRNA 的积累, 因而不存在发生互补、异源包壳、共生和重组的风险, 符合人们对生物安全性的高要求^[19]。但特殊情况下抗病毒转基因植物的生态风险还是限制其应用, 如含有病毒抑制子的非同源病毒侵染 RNA 沉默介导的抗病毒转基因植物可以翻转转基因植物的沉默状态, 导致病毒抗性的丢失和转基因 mRNA 的高水平表达, 造成转基因 mRNA 和入侵病毒

RNA 之间发生重组^[20]。Tenllado F. 等^[18]建立的快速廉价病原 dsRNA 细菌表达系统可以满足未建立遗传转化体系的作物、多寄主病毒或不能进行遗传转化的作物抗病毒。这一技术若真正应用到大田其存在的问题一是对摩擦接种病毒具有抗性的植物,却未必对天然载体接种的同一病毒产生抗性,这是因为载体能将病毒颗粒释放到植物细胞内部。大多数单链 RNA 植物病毒包括 PVY 是通过蚜虫传毒的,有关学者目前正在进行使病原 dsRNAs 不通过表皮细胞向植物组织直接渗透来防治蚜虫传毒的试验研究。二是 dsRNAs 诱导的 RNA 沉默仅存在于接种的植物组织中,而在其他叶片中则不存在,只有在干涉产品 dsRNAs 遍布整个植物体时才能起到对整株植物的保护作用。三是 dsRNAs 仅能在短期内保持抗病毒效果,在田间抗病毒时存在诸多不便,如必须在特定时间内多次喷施干涉产品、在病毒流行适宜时期激发 RNA 沉默机制才能起到应有效果。与获得抗病毒转基因植株相比,用“HT115”表达病原 dsRNAs 的 RNA 沉默技术抗病毒具有明显优势,首先在实验程序上它避开了转基因工作量繁重、周期性长、费时费力的途径;其次它能以一种简单方式投递多种病原 dsRNAs,从而获得多种抗性,而转基因植物要获得多种抗性则需要多次转化和杂交;再次外源 dsRNAs 诱导的 RNA 沉默虽能被病毒抑制子破坏,但将 dsRNAs 分子置于突变的转录调节区可以减少 dsRNAs 处理的植物中干涉产品过量积累,进而减少重组机会。最终目标是将细菌表达 dsRNAs 抗病毒体系发展成为一种环境友好高效控制植物病毒病的方法。

参 考 文 献

- 1 牛颜冰等. RNA 沉默机制及其抗病毒应用. 中国生物工程杂志, 2004, 24(2): 76~79
- 2 牛颜冰等. 瞬时表达黄瓜花叶病毒部分复制酶基因和番茄花叶病毒移动蛋白基因的 dsRNA 能阻止相关病毒的侵染. 农业与生物技术学报, 2004, 12(4): 484~485
- 3 Hammond S. M., Caudy A. A., Hannon G. J. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. Nat. Rev. Genet., 2001, 2(2): 110~119
- 4 Baulcombe D. C. Viruses and gene silencing in plants. Arch. Virol. Suppl., 1999, 15: 189~201
- 5 Fire A., Xu S., Montgomery M. K., et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998, 391(6669): 806~811
- 6 Smith N., Singh S., Wang M. B., et al. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. Nature, 2000, 407(6802): 319~320
- 7 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. Mol. Plant Pathol., 2000, 1(6): 347~356
- 8 Dalmay T., Hamilton A., Rudd S., et al. An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. Cell, 2000, 101(5): 543~553
- 9 Tenllado F., Diaz-Ruiz J. R. Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. J. Virol., 2001, 75(24): 12288
- 10 Thomas C. L., Jones L., Baulcombe D. C., et al. Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. Plant J., 2001, 25(4): 417~425
- 11 Llave C., Kasschau K. D., Carrington J. C. Virus-encoded suppressor of post-transcriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97(24): 13401~13406
- 12 Tenllado F., Barajas D., Vargas M., et al. Transient expression of homologous hairpin RNA causes interference with plant virus infection and is overcome by a virus encoded suppressor of gene silencing. Mol. Plant-Microbe Interact., 2003, 16(2): 149~158
- 13 Brigneti G., Voinnet O., Li W. X., et al. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. EMBO J., 1998, 17(22): 6739~6746
- 14 Ruiz M. T., Voinnet O., Baulcombe D. C. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. Plant Cell, 1998, 10(6): 937~946
- 15 Palauqui J. C., Balzergue S. Activation of systemic acquired silencing by localised introduction of DNA. Curr. Biol., 1999, 9(2): 59~66
- 16 Timmons L., Court D. L., Fire A. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. Gene, 2001, 263(1): 103~112
- 17 Timmons L., Fire A. Specific interference by ingested dsRNA. Nature, 1998, 395(6705): 854
- 18 Tenllado F., Martinez-Garcia B., Vargas M., et al. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. BMC Biotechnol., 2003, 3(1): 3~14
- 19 Tepfer M. Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. Annu. Rev. Phytopathol., 2002, 40: 467~491
- 20 Savenkov E. I., Valkonen J. P. Silencing of a viral RNA silencing suppressor in transgenic plants. J. Gen. Virol., 2002, 83: 2325~2335