

小RNA调节植物免疫应答反应研究进展

张子杰^{1,2}, 肖文斐², 裘劫人², 忻雅², 刘庆坡¹, 柴伟国², 阮松林^{2,*}

¹浙江农林大学农业与食品科学学院, 杭州311300

²杭州市农业科学研究院生物技术研究所, 杭州310024

摘要: 植物小RNA不仅参与调控植物生长发育, 而且在调节植物免疫应答方面具有重要作用。根据其起源和前体结构的不同, 可以分为微小RNA (miRNA)、小干扰RNA (siRNA)等, 其在植物体内合成方式与作用机制方面存在差异。病原物侵染会引起内源性小RNA或病原物来源的小RNA表达变化, 进而引发植物免疫应答反应并激活相应的RNA干扰途径。本文重点介绍了小RNA类型以及合成方式, 植物对病原物的免疫应答过程中的小RNA和RNA干扰途径, 以及RNA干扰技术在植物抗病虫害过程中的应用等方面, 同时对在植物免疫应答中的小RNA和RNA干扰作用机制进行展望。

关键词: 植物小RNA; RNA干扰; 免疫应答; 病原物侵染

小RNA (small RNA, sRNA)广泛存在于植物中, 并且种类多样, 其参与的植物基因调节细节直到近几十年才被生物学家们所重视, 大量的研究结果表明sRNA参与了植物的免疫调节反应。在1980年末至1990年初, 科学家们发现植物通过表达部分病毒的基因组以免疫该种病毒或者相似病毒的感染, 后来人们用转基因的方式实现了内源基因的沉默, 无论是转基因带来的基因沉默还是植物的病毒免疫现象, 其目的基因都具有特异性, 当时人们对这些现象潜在的机制并无所知。后来, Fire等人发现了RNA沉默现象又名RNA干扰(RNA interfering, RNAi), 它是一种长的双链RNA具有序列特异性地对内源基因实现基因沉默的现象; Hamilton和Baulcombe (1999)揭示了sRNA在转基因植物中的基因沉默过程。因此, 之前人们发现的植物表达病毒基因来免疫病毒感染以及转基因造成的基因沉默归根结底都可以理解为RNA沉默现象, 它是由植物个体表达外源转录本形成双链小RNA, 再经过一系列加工后形成小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA)来引导对内源目标基因的沉默。而sRNA不仅可以从外源基因的表达中获得, 早在1993年, 科学家们在线虫中发现了一种内源的sRNA, 后来被命名为微小RNA (microRNA, miRNA), 随着测序技术的进步以及生物信息学的发展, 科学家们发现了更多的内源sRNA。

植物对外来病原体的免疫一直以来都是生物学家研究的重点, 病原体通常以入侵植物免疫系统, 寄生于寄主细胞作为他们的生存法则, 而一般

植物使用病原体相关的分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)来触发免疫, 随后, 病原体通过进化出一套效应蛋白来抑制植物免疫系统, 植物则进化出了抗性基因(resistance gene, R gene)来编码抗性蛋白应对病原体, 这种抗性蛋白可以识别特异的病原物, 然后引导植物产生免疫应答反应。病原体同样会进化出更加多种多样的效应蛋白基因试图攻克植物的免疫系统, 植物和病原体就以这样无休止的方式进化下去。

许多研究表明, 植物sRNA以及植物体内的一些RNAi机制在调节植物对抗病原体的过程中起到关键作用。最近的研究发现病原物体内的sRNA以及RNAi机制控制着病原体的毒性(Ding 2010)。植物病理学家们开始大量研究来自植物和病原物中与免疫应答相关的sRNA的表达形式, 研究发现绝大多数来自丝状病原物的sRNA由转座子转录而来, 而在真核生物尤其一些真菌病原物中主要通过sRNA对转座子基因的沉默普遍存在(Chang等2012)。

1 sRNA种类及合成作用方式

sRNA普遍存在于植物中, 根据不同起源、结构特征和功能的差异主要可以分为miRNA、siRNA、

收稿 2017-12-18 修定 2018-03-15

资助 国家重点研发计划项目(2017YFD0200900)、杭州市农业与社会发展科研自主设计项目(20172015A02)和杭州市重大科技创新项目(20131812A02)。

* 通讯作者(ruansl1@hotmail.com)。

piRNA (PIWI-interacting RNA)几种类型。它们主要由RNA聚合酶II合成双链小RNA, 经过Dicer-like (DCL)酶的进一步剪切以及一系列加工过程形成单链或者双链成熟sRNA, 接着成熟sRNA与Argonaute (AGO)家族蛋白结合形成沉默复合物, 对目标基因起到沉默作用, 而AGO蛋白家族主要可以分为两个分支——AGO和PIWI, AGO蛋白主要与miRNA和siRNA结合, PIWI蛋白主要与piRNA结合。

1.1 miRNA的发现、合成和作用方式

1.1.1 miRNA的发现

1993年, Lee等利用图位克隆的方法在秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)中发现了世界上第一个miRNA——*lin-4*, 并克隆了其基因, 研究发现这个非编码基因可以产生一种只有22 nt大小的sRNA, 并与*lin-14*基因的3'非编码区域(3' untranslated region, 3'UTR)不完全互补配对, 抑制基因的翻译过程, 阻碍线虫幼虫生长从L1期向L2期的转变。由于传统的图位克隆方式发现miRNA的效率极低, 直到2000年另外一个线虫miRNA基因*let-7*才被发现, 它的靶基因*lin-41*控制着线虫从幼虫到成虫的发育过程。2001年科学家们使用了新的克隆方法在植物与动物中发现了更多的miRNA, 才开始重视被称为“垃圾DNA”的非编码基因, 2002年*Science*杂志将sRNA和RNAi技术列为当年最佳。后来随着测序技术的突飞猛进和生物信息学的发展, 对miRNA的研究更加深入, 到目前为止, miRNA数据库已经收录了各物种的18 226个miRNA前体(precursor-miRNA, pre-miRNA)、21 643个成熟miRNA, 而且其家族还在不断扩大(Ruvkun等2004)。

1.1.2 植物miRNA的合成和作用方式

首先, 植物miRNA在细胞核内由RNA聚合酶II转录出初级miRNA (primary miRNA, pri-miRNA), 它与转录形成的信使RNA一样, 带有5'帽子和3' poly(A)尾巴, 经由DCL1两次切割, 第一次切割的产物为带有茎环结构的pre-miRNA, 成熟的miRNA在它的两条臂上; 而第二次切割的产物为miRNA::miRNA*二聚体, 随后该二聚体3'末端两个羟基被甲基化转移酶(histone methyltransferases 1, HEN1)所修饰, 以防止被RNA降解酶降解。接下来这个二聚体被转运蛋白运出细胞核, 在细胞质中解旋,

其中成熟的miRNA单链与AGO蛋白结合形成沉默体复合物(RNA-induced silencing complex, RISC), 另外一条miRNA*降解。至于二聚体中哪一条miRNA会与AGO蛋白相互结合, 普遍认为这取决于两条链中哪条链更不稳定, 一般来说不稳定miRNA单链的5'端更容易解旋同时自由的5'磷酸基团会与蛋白轻易结合形成RISC, 此外5'端的第一个核苷酸也决定了AGO蛋白对miRNA的选择, 第一个核苷酸为尿嘧啶的miRNA更加容易形成沉默复合物。

miRNA与AGO蛋白结合后即开始行使调节靶基因的作用, 当miRNA与目标靶基因完全互补配对或者几乎完全互补配对时, miRNA可以降解靶基因; 当miRNA与靶基因不完全互补配对时, miRNA仅仅只抑制靶基因的翻译过程。然而在植物中, miRNA对靶基因的作用绝大多数都是将其降解。对靶基因的切割过程主要由AGO蛋白来履行, AGO蛋白拥有PAZ、MID和PIWI三个结构域, PAZ与sRNA的3'端结合, MID与sRNA的5'端结合, PIWI结构域具有RNA酶H的内切酶活性, 当miRNA与靶基因互补程度高时, PIWI开始精确切割靶基因。

1.2 植物内源性siRNA的种类和合成方式

植物内源性的siRNA长度在21~24 nt之间, 是由长的双链RNA作为前体, 被Dicer酶剪切形成双链小RNA, 其中不太稳定的一条链与AGO蛋白结合形成沉默复合物。

重复序列siRNA (repeat associated siRNA, rasiRNA)是由转座子重复序列转录而来, 转录时DNA正反义链同时转录形成互补的双链小RNA, 通过调节形成异染色质阻碍基因的转录。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中, 首先, 转座子重复序列在RNA聚合酶IV的作用下合成两条单链小RNA, 然后在依赖于RNA的RNA聚合酶的作用下合成双链RNA, 此时RNA聚合酶IV能够以dsRNA为模板合成rasiRNA, 放大这种小RNA的合成信号, dsRNA在DCL3酶切割后经过HEN1甲基化修饰成为成熟的siRNA, 与AGO4蛋白结合形成沉默复合体使得染色体异染色质化达到基因沉默的效果。

反式作用siRNA (*trans-acting* siRNA, tasiRNA)的生成需要miRNA参与。在植物中, *TAS*基因经过RNA聚合酶II转录生成tasiRNA初级转录本(pri-

tasiRNA), 这些转录本普遍具有miRNA切割位点, 在被miRNA切割过后形成两个RNA片段, 一个片段带有5'帽子, 另一个含有poly(A)尾巴, 其中较长的一个片段在依赖于RNA的RNA聚合酶作用下形成双链RNA, 接着在DCL4的切割下可以形成不同的tasiRNA片段, 与不同的AGO蛋白结合作用于不同的靶基因。比如拟南芥miRNA390可以切割*TAS2*转录本, 形成的tasiRNA调控*ARF*因子的表达, 同时miRNA390自己也调控一个关键的受体激酶(Kim等2011)。tasiRNA与miRNA具有千丝万缕的关系, 在植物免疫调控中具有重要的研究意义。

天然反义siRNA (natural antisense transcript siRNA, natsiRNA)是由基因组上连续的顺势反义基因的重复序列转录而来, 它的作用主要是在植物中应对非生物胁迫, 如拟南芥*SRO5*和*P5CDH*基因分别位于基因的正反链上, 它们之间部分重叠, 经过RNA聚合酶II转录后他们的转录本可以互相重叠在一起, 经过DCL酶的剪切形成成熟natsiRNA, 用来应对高盐胁迫。

2 植物免疫系统中的sRNA和RNAi途径

2.1 植物与真菌、细菌互作过程中的sRNA

植物在遭受细菌和真菌侵染时, 其体内会不同程度表达一定的sRNA, 用来微调对病原物入侵的免疫应答(表1)。拟南芥miR393是之前发现的第一个在植物免疫应答过程中起到关键作用的sRNA, 在拟南芥中它可以被flg22 (一种PAMP)诱导, miR393作用于它的靶基因, 控制植物生长素的受体基因*TIR1*以及该基因的同系物, 同时可以抑制植物生长素信号路径, 因此它可以使植物产生PAMP触发免疫(PAMP-triggered immunity, PTI)。一些保守的拟南芥miRNA, 比如miR160和miR167, 也是由PAMP诱导形成并且最终可以导致植物产生PTI (Navarro等2006), 但是另外一些miRNA如miR398a和miR773, 在受到PAMP诱导和细菌侵染时, 表达量下降, 通过解除对靶基因的抑制效果来激发PTI过程(Li等2010)。sRNA也在植物效应子触发免疫(effector-triggered immunity, ETI)过程中

表1 病原菌诱导植物产生的sRNA种类、对应的靶基因和功能

Table 1 Types, corresponding target genes and functions of plant sRNAs induced by pathogens

物种	sRNA	靶基因	功能	参考文献
拟南芥	miR393	<i>TIR1</i> 、 <i>AFB</i> 、 <i>AFB3</i>	抑制生长素信号路径并与细菌侵染有关	Navarro等2006
	miR160	<i>ARF6</i> 、 <i>ARF8</i>	与生长素信号途径及抗细菌侵染相关	Navarro等2006
	miR167	<i>ARF10</i> 、 <i>ARF1</i> 、 <i>ARF17</i>	与生长素信号途径及抗细菌侵染相关	Navarro等2006
	miR398a	SOD基因	细菌侵染后miR398a表达量降低, 与抗细菌侵染有关	Li等2010
	miR773	SOD基因	细菌侵染后miR773表达量降低, 与抗细菌侵染有关	Li等2010
	nat-siRNAATGB2	<i>PPRL</i>	抑制RPS2抗病基因的负调控元件	Katiyar等2006
	miR393*	<i>MEMB12</i>	抗病毒相关蛋白胞外分泌的增加	Zhang等2011
	miR400	PRR蛋白基因	过表达miR400植株对病原物更加敏感	Park等2014
	miR844	CDS3蛋白基因	过表达miR844植株对病原物更加敏感	Lee和Yeom 2015
水稻	miR160	<i>ARF16</i>	与生长素信号途径及抗稻瘟病菌侵染相关	Li等2013
	miR164	NAC家族转录因子	与生长素信号途径及抗稻瘟病菌侵染相关	Li等2013
	miR396	SOD基因	稻瘟病菌侵染miR396表达下降, 与抗稻瘟病菌侵染相关	Li等2013
	miR7695	NRAMP蛋白基因	miR7695上调表达增加水稻对稻瘟病菌抗性	Campo等2013
茄子	miR393	<i>TIR1</i>	黄萎病菌侵染miR393表达下降, 与对死体营养型病原物抗性相关	Navarro等2006
	miR399	<i>PHO2</i>	黄萎病菌侵染miR399表达下降, 与对死体营养型病原物抗性相关	Navarro等2006
棉花	miR482	NBS-LRR基因	黄萎病菌侵染miR482表达下调, 减少tasiRNA的产生增强抗性基因表达作用	Zhu等2013
马铃薯	miR482e	NBS-LRR基因	过表达miR482e基因, 植株对黄萎病更加敏感	Yang等2015
大豆	miR403	AGO蛋白基因	卵菌侵染时表达下降, AGO蛋白增多, 增强PTI	Guo等2011
烟草	miR6019	TIR-NB-LRR基因	miR6019表达上调烟草对烟草花叶病毒抗性减弱	Li等2012
	miR6020	TIR-NB-LRR基因	miR6020表达上调烟草对烟草花叶病毒抗性减弱	Li等2012

具有重要作用, 比如拟南芥nat-siRNAATGB2是第一个发现的调节植物抗性基因免疫相关的siRNA, 当拟南芥被细菌病原丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)侵染时, 该细菌自身携带有一个效应基因*avrRpt2*, 可以诱导siRNA高表达, siRNA可以通过抑制*RPS2*抗性基因表达通路的负调控元件, 致使拟南芥开始ETI过程。拟南芥中的miR393*也是由效应基因*avrRpt2*诱导的, 这种miRNA存在于miR393互补的另一条链上, 它与AGO2蛋白结合后通过抑制*MEMB12*基因调节植物免疫, *MEMB12*基因编码一个高尔基体上的逆转运蛋白, *MEMB12*基因的抑制会导致抗病毒相关蛋白胞外分泌的增加(Zhang等2011)。此外, 拟南芥过表达miR400或过表达miR844的转基因株系在丁香假单胞菌和灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)侵染时相较于野生型拟南芥都更加敏感, miR400以编码PPR蛋白基因为靶基因, 该蛋白可以特异性识别单链RNA, 而miR844以编码胞苷磷酸甘油二酯合成酶3基因(*cytidinephosphate diacylglycerol synthase 3*, *CDS3*)为靶基因(Park等2014; Lee和Yeom 2015)。

大多数的植物抗性基因属于核苷酸结合区-亮氨酸富集区域(nucleotide binding site-leucine-rich repeat, NBS-LRR)基因家族, 同时它也是sRNA转录区, 在很多植物物种抗性基因的NBS-LRR区域, 鉴定到了tasiRNA, 这些siRNA是由特定的miRNA家族剪切NBS-LRR转录本形成的片段合成的, 比如番茄(*Lycopersicon esculentum*)和棉花(*Gossypium* spp.)中的miR482和miR2118, 还有烟草(*Nicotiana tabacum*)中的miR6019和miR6020, 这些miRNA和siRNA让植物在正常情况下对NBS-LRR区域的翻译在一个较低的水平, 当植物遭受细菌侵染时, miRNA对NBS-LRR区域的剪切被抑制, 抗性基因的表达上调, 植物开启免疫应答模式(Shiva-prasad等2012; Zhu等2013)。

在植物中还鉴定出了许多内源sRNA用以应对真菌的侵染, 在水稻中, 稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)因易侵染一些感病的水稻栽培品种而对水稻的抗病性研究极具挑战性, 通过比较稻瘟病菌侵染后感病和抗性水稻品种的sRNA变化, 发现了一些内源的miRNA参与由该病菌激发的免疫应答过程。如在水稻(*Oryza sativa*)抗病品种中miR160

和miR164受稻瘟病菌诱导, 表达量增加(Li等2013), 但是miR398在稻瘟病菌侵染时表达下降, 而在感病型品种中其表达量不变, 说明不同的miRNA对ETI过程可以正调控或负调控。此外, miR169、miR172和miR398在水稻感病和抗病品种中表达量都有变化, 说明这些miRNA调节水稻基础应答反应(Li等2013), miR160的靶基因是植物生长素应答因子16 (auxin response factor 16, ARF16)和miR398的靶基因过氧化物歧化酶2 (superoxide dismutase 2, SOD2), 这些靶基因在稻瘟病菌侵染时表达量都降低, 这与所诱导形成的miRNA表达量上调吻合(Li等2013)。通过在感病型水稻品种中构建miR160和miR398过表达转基因植株, 发现转基因植株提高了对稻瘟病菌的抗性, 证明上述miRNA确实在水稻抵御稻瘟病菌的免疫应答中起着正向调节作用(Li等2013)。此外, miR7695是一类水稻独有的miRNA家族, 过表达miR7695转基因水稻株系对水稻稻瘟病菌具有更好抗性, miR7695以NRAMP蛋白基因为靶基因, 该蛋白与一些金属离子代谢平衡相关, 而金属离子与水稻免疫之间的关系还有待进一步研究(Campo等2013)

在小麦(*Triticum aestivum*)中, 用小麦白粉病菌(*Blumeria graminis*)侵染抗病和感病的品种, 比较分析sRNA后获得了3种调节miRNA, 第一种只在抗病小麦品种中具有应答反应, 如表达量上调的miR2008和miR2012以及表达量下调的miR171; 第二种只在感病小麦品种中参与免疫应答反应, 比如表达量增加的miR393、miR444、miR827、miR2005和miR2013以及表达量下调的miR2001、miR2006和miR2011; 第三种共同参与抗病和感病品种的免疫应答过程, 包括miR156、miR159、miR164和miR396 (Xin等2010)。另有一类独特的miRNA, 包括miR167、miR171、miR444、miR408和miR1138, 只在小麦条锈病菌(*Puccinia striiformis*)侵染小麦早期的两个感病品种中被诱导(Gupta等2012)。根据内源性的靶标基因, 这些miRNA可能通过调节激素信号通路、木质素合成和蛋白合成等途径参与植物早期的免疫应答反应。

在茄子(*Solanum melongena*)中, 33个与免疫应答黄萎病菌(*Verticillium albo-atrum*)相关的miRNA被鉴定。当受黄萎病菌侵染时, miR393和miR399

的表达下调, 导致其靶基因Toll蛋白受体和白介素受体I基因(*Toll and interleukin 1 receptor, TIR1*)以及E2结合酶基因*PHO2*表达增加, 而*TIR1*能够增强植物对死体营养型病原物的抗性, 但是不利于植物对活体营养性病原物的抵御(Navarro等2006)。

在棉花中, 300个NBS-LRR基因中有潜在的30个基因受到miR482家族成员的调控, miR482在棉花中以NBS-LRR基因保守的P环序列为靶标, miR482对NBS-LRR转录本的剪切同时产生了次级siRNA, 即tasiRNA, 它可以增强对这些NBS-LRR基因的沉默作用。在受棉花黄萎病菌感染时, miR-482表达下调, 与之对应的10个NBS-LRR基因解除表达抑制状态, 在病原物感染时, 通过下调miR482基因的表达, 可以关闭这些sRNA对抗性基因的抑制作用, 从而激活抗性基因(Zhu等2013)。而在马铃薯(*Solanum tuberosum*)中, 研究者发现了同样来自miR482家族的miR482e在黄萎病菌感染时显著上调表达, 通过构建miR482e过表达马铃薯转基因植株, 发现转基因植株对黄萎病菌更加敏感(Yang等2015)。

同样地, 在卵菌感染的植物中也发现了这些能够改变miRNA表达模式的现象, 在检测带有对卵菌不同水平抗性的三个大豆(*Glycine max*)品种后发现, miR403以AGO蛋白基因为靶基因的sRNA, 在3个抗病品种中表达均下调, 从而增加了AGO蛋白表达, 增强了PTI过程, 说明RNAi机制在寄主抵御卵菌过程中有积极的作用(Guo等2011)。

总之, 植物内源的sRNA在调节植物抗性基因和引发植物对感染的病原物的免疫应答过程中具有重要作用。

2.2 sRNA与植物免疫病毒过程

与siRNA相关的植物抗病毒的机制主要由病毒siRNA (virus-derived siRNA, vsiRNA)调控, 被感染植物中的vsiRNA主要是由病毒基因组复制形成双链RNA被DCL酶类剪切形成, vsiRNA生成后可以与病毒体内的RNA序列结合从而引发病毒转录本降解, 作用机制与植物其他内源siRNA一致。一般来说, 植物RNA沉默机器可以招募4类蛋白来抵抗病毒, 包括DCL、双链RNA结合蛋白(double-stranded RNA binding protein, DRB)、AGO和RNA依赖的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA poly-

merase, RDR)。在拟南芥中, 主要有4类DCL蛋白参与病毒免疫过程, 其中DCL4在抵御病毒过程中占主要作用, 它可以将病毒来源的双链RNA加工成21 nt的vsiRNA, 而DCL2可以加工生成22 nt的vsiRNA, 主要负责对一些适应性病毒进行防御。DCL3加工生成24 nt的vsiRNA, 主要抵御DNA病毒如花椰菜花叶病毒(*Cauliflower mosaic virus, CaMV*)和一些双生病毒, DCL1可以加工产生siRNA和miRNA, 但在植物病毒防御方面作用机制较为复杂。多类型的DCL蛋白为植物抵御各种类型的病毒感染时提供了丰富的应对策略。

RDR在vsiRNA生成过程中至关重要, Wei等(2015)发现OsRDR6在水稻免疫水稻条纹病毒(*Rice stripe virus, RSV*)和水稻矮缩病毒(*Rice dwarf virus, RDV*)时具有重要作用, 对OsRDR6表达基因沉默后, 水稻对RDV感染表现敏感, 暗示了OsRDR6蛋白的翻译和表达稳定性提高可以降低病毒的感染。

病毒来源的vsiRNA对病毒的免疫主要有两种机制, vsiRNA可以被AGO蛋白招募, 通过转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)方式直接降解病毒RNA。Zhu等(2011)人工合成了来源于黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus, CMV*)卫星RNA区域的AsatsiR-12, 发现它作用于CMV的3'UTR区域同时引发植物RDR6依赖的抗病毒沉默路径, 明显降低植物病害症状。此外, vsiRNA还可以与AGO蛋白结合后作用于病毒DNA, 通过对入侵病毒DNA加强甲基化来沉默病毒基因。Raja等(2014)发现拟南芥在双生病毒感染时, 拟南芥中的DNA甲基化酶以及相关的作用因子表达上调, 同时在拟南芥中找到作用于双生病毒甲基化过程中的DRB3、DCL3和AGO4。最后, vsiRNA还被认为当其可以与宿主RNA几乎完全两两匹配时, 就可以沉默宿主部分基因的表达过程, 这可能与宿主被病毒感染时的病害表型相关, 比如CMV-Y卫星RNA来源的siRNA可以与黄瓜中CHLI mRNA上的22 nt区域匹配, 阻碍叶绿素的生物合成过程, 造成叶片黄化(Shimura等2011); 此外马铃薯纺锤块茎病毒来源的siRNA可以沉默许多茄科类植物中胼胝质合成相关基因, 降低植物抗病性(Adkar等2015)。

内源sRNA在一些植物病毒免疫过程中也具有重要作用, 比如Li等(2012)在烟草中鉴定到了

nat-miR6019和nat-miR6020, 它们以TIR-NB-LRR免疫受体的转录本为靶基因, 将免疫受体基因和这两个miRNA基因共表达, 发现烟草中TIR-NB-LRR免疫受体介导的抗烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)能力下降。此外, miR6019对转录本的剪切可以产生一些次级小RNA (tasiRNA), 进一步沉默抗性基因。

2.3 植物免疫应答过程中RNAi途径的重要组分

在植物对病原物免疫应答过程中, 几个植物RNAi途径的组分具有重要作用(Seo等2013), 在拟南芥中, DCL1和DCL4分别是合成miRNA和siRNA的关键组分, 拟南芥*dcl1-9*突变体对细菌的侵染敏感性增强, 同样*dcl1-7*突变体对真菌的侵染更敏感, 说明RNAi参与植物对病原物免疫过程(Weiberg等2013)。RDR在植物免疫应答的RNAi过程中也具有重要作用, 它负责生成双链RNA, 然后由DCL酶剪切形成sRNA。拟南芥基因组总共编码了6个RDR, RDR6参与植物合成次级siRNA过程, 拟南芥*rdr6*转基因突变体更易受细菌和真菌的侵染(Ellendorff等2009)。有趣的是, 基因沉默抑制物1(*sgs1*)、*sgs2/rdr6*和*sgs3*突变体对不同致病性的黄萎病菌敏感性逐渐提高, 但是对于不同致病性的真菌病原物, 其发病症状却没有变化。虽然SGS1还未被克隆, 但是RDR6 (SGS2)和SGS3之间存在互作, 是次级siRNA生物合成和基因沉默所必须的, 说明植物抵御黄萎病菌需要某种特异性的次级siRNA调节(Ellendorff等2009)。

在拟南芥中有10个AGO蛋白, AGO2在细菌侵染时被高诱导, 是植物对细菌病原物免疫应答中的关键正向调节因子, 在拟南芥*ago2*突变体中, 植物对丁香假单胞菌有毒和无毒菌株敏感性都增强, 其中一个与AGO2蛋白结合频率最高的sRNA是miR393*, 它可以抑制一个SNARE蛋白基因同时促进分泌一种抗微生物的肽段(Zhang等2011)。而miR393与AGO1蛋白结合引导植物免疫应答过程, 说明双链成熟miRNA和miRNA*可以通过结合不同的AGO蛋白行使相似的细胞功能。AGO1蛋白通过与不同的miRNA结合, 在PTI过程中扮演着重要角色, 如miR160和miR167与AGO1蛋白结合后, 以ARF为靶基因, 从而正向调节PAMP引发的胼胝质沉积过程。拟南芥*ago1-25*和*ago1-27*突变体在

*flg22*引发的PTI过程中免疫力下降, 同时对细菌类病原物更加敏感, 有趣的是, *ago1-27*突变体在受真菌类病原物如棉花黄萎病菌(Ellendorff等2009)和番茄霜霉菌(Weiberg等2013)侵染时的抗病性反而增强, 说明AGO1蛋白在植物抵御真菌入侵时具有不同于植物抵抗细菌的作用, 可能具有额外的调节功能。

3 RNAi技术在植物抗病虫过程中的应用

3.1 植物与病原物互作过程中的RNAi

真菌的sRNA效应物能够被传导进入宿主细胞, 从而抑制植物免疫系统实现侵染的目的, 这种基因沉默行为可以被认为是在自然界中跨界的RNAi作用, 这种RNAi机制出现在高等进化的真菌病原物中, 同时科学家们也发现植物中的一些sRNA可以从植物细胞进入真菌病原物、寄生于植物的生物中或者昆虫体内, 这些转入的基因在入侵者的体内表现出RNAi作用, 对线虫、昆虫、植物寄生物种以及真菌病原物体内的靶基因产生作用以抵御其入侵, 这种机制被称为宿主诱导的基因沉默(host-induced gene silencing, HIGS), 已用于通过研究特定的昆虫和病原物体内的基因, 提高作物的抵抗力(Nunes和Dean 2012)。HIGS是典型的跨界RNAi, 植物通过从自身向病原物转移沉默信号分子, 来实现抵御入侵者的目的。最近, 在人类和动物血清中探测到了被食用的植物miRNA, 说明跨界的RNAi可以发生在各种系统中(Zhang等2012)。

像长双链RNA、sRNA双链的沉默信号分子的移动在线虫中已经有详细研究(Hinas等2012), 在植物sRNA中, 进行胞间转移的沉默信号分子主要是一些21 nt sRNA双链, 然而参与RNAi过程的主要是24 nt sRNA (Dunoyer等2011)。此外, 科学家们还发现自然界中的miRNA存在从寄主植物向寄生物穿梭的现象, 但是目前仍无法解释沉默信号分子是如何移动的, 特别是在不同物种之间。

3.2 RNAi技术在植物抗虫过程中的应用

利用RNAi技术防治害虫主要是非细胞自主式RNAi, 即害虫通过取食摄入双链RNA, 通过自身RNAi系统沉默基因。植物寄生线虫可以通过取食管吸取双链RNA, 这会使线虫部分基因沉默。

此后, 科学家在转基因植株中表达线虫体内特异靶基因的双链RNA, 相应的双链RNA或siRNA通过线虫取食管进入线虫体内, 依靠线虫自身RNAi机制沉默线虫体内靶基因, 起到防治线虫病害的作用, 而这种机制与线虫体内的跨膜蛋白SID-1密切相关, 此外, 在半翅目、鳞翅目、鞘翅目和膜翅目等昆虫中发现了*sid*同源基因, 说明部分昆虫体内也具有类似的RNAi系统。

Huang等(2006)在拟南芥中表达了南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*) 16D10基因的发夹结构RNA, 该基因在线虫中编码一种线虫分泌肽, 研究发现与对照植株相比, 转基因植株的根结线虫数量下降了63%~93%。Steeve等(2006)利用大豆胞囊线虫中的RNAi机制, 以编码线虫中特异蛋白MSP的基因为靶基因(该基因调控线虫精子繁殖和运动), 在转基因大豆中表达相应的siRNA, 结果表明转基因大豆根中胞囊线虫(*Heterodera glycines*)数量减少了68%, 此外, 残存线虫后代的繁殖能力也大大减弱。Dubreuil等以对线虫胚胎发育具有关键作用的肌钙蛋白C基因和参与线虫与寄主互作的致病基因为靶基因, 在转基因烟草中表达相应的siRNA, 在烟草上接种根结线虫, northern检测结果发现在线虫中相应基因转录水平降低。

在拟南芥和烟草中表达含有棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)细胞色素P450基因片段的双链RNA, 研究发现这些转基因植株降低了棉铃虫P450基因的表达量, 同时抑制了其幼虫的生长。Tang等(2010)向甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)中注射两种贮存蛋白相关的双链RNA, 发现一段时间后, 夜蛾生存率分别降低为38.7%和24.3%。

3.3 RNAi技术在植物抗真菌过程中的应用

对于植物来说, 真菌引起的病害是主要病害, RNAi技术在防治植物真菌病害上的应用具有重要意义。Nowara等在2010年将表达靶向真菌葡聚糖转移酶基因的双链RNA转入大麦(*Hordeum vulgare*)中, 提高了大麦对白粉病的免疫能力, 使得RNAi技术在防治真菌病害上的应用逐渐发展起来。Zhang等(2012)利用大麦条纹花叶病毒(*Barley stripe mosaic virus*, BSMV)介导的病毒诱导的基因沉默(virus induced gene silencing, VIGS)瞬时表达体系, 在小麦中干扰了小麦条锈病菌钙依赖磷酸酶基因的表达,

同时延缓了菌丝的扩展。Ghag等(2014)以尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的*Velvet*基因和转录因子Ftfl为靶基因, 在香蕉(*Musa nana*)中分别表达它们的RNAi载体, 发现由该病原菌引起的香蕉萎蔫病出现好转。Wang等(2016)以灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)和黄萎病菌中Dicer同源蛋白基因为靶基因, 在拟南芥中表达相关基因的RNAi载体, 发现转基因拟南芥植株兼有两种真菌的抗性。

3.4 RNAi技术在防治病毒过程中的应用

将病毒中的某一序列设计成双链结构, 在植株体内表达相应的双链RNA, 诱发植株对感染病毒RNAi, 使转基因植株具有对病毒一定的免疫能力, 这是RNAi技术在防治植物病毒病上的主要思路。

Wang等(2010)将大麦黄萎病菌中复制酶基因为靶基因, 设计以该基因序列反向重复序列为基础可产生发夹结构的载体, 在大麦中转化表达, 在25个转化系中有9个转化系表现出较强的病毒抗性, 同时酶联免疫吸附检测(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)结果显示无病毒存在。Haameed等(2017)将马铃薯三种病毒——马铃薯病毒X(*Potato virus X*, PVX)、Y(*Potato virus Y*, PVY)、S(*Potato virus S*, PVS)基因序列设计成600 bp反向重复序列载体, 该体系可以产生具有发夹结构的双链RNA, 获得的马铃薯转基因株系具有对三种病毒的抗性。Ahmed等(2017)将水稻黑条矮缩病毒(*Rice black-streaked dwarf virus*, RBSDV)侵染植株过程中的关键蛋白P7-2和P8编码基因为靶标, 设计的RNAi载体在水稻植株中表达, 病毒田间侵染结果显示多个转基因株系后代具有较强抗性。

4 展望

sRNA和RNAi在植物免疫应答过程中具有重要的作用, 一些真菌sRNA可以作为效应分子进入植物体内利用RNAi机制沉默植物体内的靶基因, 从而攻克植物免疫系统, 同时植物也进化出抗性基因用来抵御病原物。在一些病原物的效应物作为抑制分子抑制了植物免疫系统应答的同时, 一部分的效应物也作为激发子引发了植物PTI过程, 甚至植物的sRNA也可以进入病原物利用RNAi机制沉默病原物体内的基因。大量的研究表明, 不管是病原物的sRNA效应物还是一些效应蛋白都

来自于转座子基因区域, 同样, 植物的抗性基因也绝大多数来自于转座子富集的基因, 这些分子特征印证了两者之间不断进化的“军备竞赛”, 由于转座子区域转录产生了大多数sRNA, 可以调节表达效应物基因和宿主抗性基因, 同时转座子基因容易发生突变和转移, 为基因的进化提供了基础。

以HIGS机制为主的RNAi体系在植物免疫病原物的过程中发挥着重要作用, 为一些抗病资源稀缺的作物提供了一个有效途径。但在应用实践过程中也存在一些问题, 比如, 一些转基因植株可以抑制一些真菌基因表达, 但病原菌的生长发育和孢子的形成并未受到影响。目前, 对于真菌是如何摄取双链RNA的方式仍不清楚。不同类型真菌与不同寄主之间互动时, 具有不同的sRNA分子交换机制, 因此会很难获得广谱型免疫的植株。此外, 一些RNAi转化体系存在严重的脱靶效应, 获得抗性较强的转基因株系比较困难。Koch等(2016)选择将人工合成的双链RNA喷施在大麦叶片表面, 在叶片接种禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*), 病原物的生长侵染受到一定抑制。也有一些研究者选择将人工合成的miRNA和siRNA直接喷施在植株表面, 同样起到了一定的防治效果。

生物学家们对于解析植物免疫应答中的sRNA和RNAi机制仍有许多路要走, 植物是如何一步步利用体内非编码RNA抵御病原物以及病原物的非编码RNA是如何刺激植物产生免疫应答过程等有趣的问题依然值得去研究。

参考文献(References)

- Adkar-Purushothama CR, Brosseau C, Giguère T, et al (2015). Small RNA derived from the virulence modulating region of the *Potato spindle* tuber viroid silences *callose synthase* genes of tomato plants. *Plant Cell*, 27 (8): 2178–2194
- Ahmed MMS, Bian S, Wang M, et al (2017). RNAi-mediated resistance to rice black-streaked dwarf virus in transgenic rice. *Transgenic Res*, 26 (2): 197–207
- Campo S, Peris-Peris C, Siré C, et al (2013). Identification of a novel microRNA (miRNA) from rice that targets an alternatively spliced transcript of the *Nramp6* (*Natural resistance-associated macrophage protein 6*) gene involved in pathogen resistance. *New Phytol*, 199 (1): 212–227
- Chang SS, Zhang Z, Liu Y (2012). RNA interference pathways in fungi: mechanisms and functions. *Annu Rev Microbiol*, 66: 305–323
- Ding SW (2010). RNA-based antiviral immunity. *Nat Rev Immunol*, 10: 632–644
- Dunoyer P, Schott G, Himber C (2011). Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science*, 328: 912–916
- Ellendorff U, Fradin EF, de Jonge R, et al (2009). RNA silencing is required for *Arabidopsis* defence against *Verticillium* wilt disease. *J Exp Bot*, 60: 591–602
- Ghag SB, Shekhawat UKS, Ganapathi TR (2014). Host-induced post-transcriptional hairpin RNA-mediated gene silencing of vital fungal genes confers efficient resistance against *Fusarium* wilt in banana. *Plant Biotechnol J*, 12 (5): 541–553
- Guo N, Ye WW, Wu XL, et al (2011). Microarray profiling reveals microRNAs involving soybean resistance to *Phytophthora sojae*. *Genome*, 54: 954–958
- Gupta OP, Permar V, Koundal V, et al (2012). MicroRNA regulated defense responses in *Triticum aestivum* L. during *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* infection. *Mol Biol Rep*, 39: 817–824
- Hameed A, Tahir MN, Asad S, et al (2017). RNAi-mediated simultaneous resistance against three RNA viruses in potato. *Mol Biotechnol*, 59 (2–3): 73–83
- Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999). A species of small anti-sense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286: 950–952
- Hinas A, Wright AJ, Hunter CP (2012). SID-5 is an endosome-associated protein required for efficient systemic RNAi in *C. elegans*. *Curr Biol*, 22: 1938–1943
- Hong W, Qian D, Sun R, et al (2015). *OsRDR6* plays role in host defense against double-stranded RNA virus, *Rice Dwarf Phytoreovirus*. *Sci Rep*, 5: 11324
- Huang G, Allen R, Davis EL, et al (2006). Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103 (39): 14302–14306
- Kim KW, Eames AL, Waterhouse PM (2011). RNA processing activities of the *Arabidopsis* argonaute protein family. In: Grabowski P (ed). *RNA Processing*. Rijeka, Croatia: InTechOpen
- Koch A, Biedenkopf D, Furch A, et al (2016). An RNAi-based control of *Fusarium graminearum* infections through spraying of long dsRNAs involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery. *PLoS Pathog*, 12 (10): e1005901
- Lee HA, Yeom SI (2015). Plant NB-LRR proteins: tightly regulated sensors in a complex manner. *Brief Funct Genomics*, 14 (4): 233–242
- Li F, Pignatta D, Bendix C, et al (2012). MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109: 1790–1795

- Li Y, Lu YG, Shi Y, et al (2013). Multiple rice microRNAs are involved in immunity against the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Physiol*, 164: 1077–1092
- Li Y, Zhang QQ, Zhang J, et al (2010). Identification of microRNAs involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered plant innate immunity. *Plant Physiol*, 152: 2222–2231
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, et al (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, 312: 436–439
- Nunes CC, Dean RA (2012). Host-induced gene silencing: a tool for understanding fungal host interaction and for developing novel disease control strategies. *Mol Plant Pathol*, 13: 519–529
- Park YJ, Lee HJ, Kwak KJ, et al (2014). MicroRNA400-guided cleavage of pentatricopeptide repeat protein mRNAs renders *Arabidopsis thaliana* more susceptible to pathogenic bacteria and fungi. *Plant Cell Physiol*, 55: 1660–1668
- Raja P, Jackel JN, Li S, et al (2014). *Arabidopsis* double-stranded RNA binding protein DRB3 participates in methylation-mediated defense against geminiviruses. *J Virol*, 88 (5): 2611–2622
- Ruvkun G, Wightman B, Ha I (2004). The 20 years it took to recognize the importance of tiny RNAs. *Cell*, S116: S93–S96
- Seo JK, Wu J, Lii Y, et al (2013). Contribution of small RNA pathway components in plant immunity. *Mol Plant Microbe Interact*, 26 (6): 617–625
- Shimura H, Pantaleo V, Ishihara T, et al (2011). A Viral satellite RNA induces yellow symptoms on tobacco by targeting a gene involved in chlorophyll biosynthesis using the RNA silencing machinery. *PLoS Pathog*, 7 (5): 427–436
- Shivaprasad PV, Chen HM, Patel K, et al (2012). A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site–leucine-rich repeats and other mRNAs. *Plant Cell*, 24: 859–874
- Steeves RM, Todd TC, Essig JS, et al (2006). Transgenic soybeans expressing siRNAs specific to a major sperm protein gene suppress *Heterodera glycines* reproduction. *Funct Plant Biol*, 33 (11): 991–999
- Tang B, Wang S, Zhang F (2010). Two storage hexamerins from the beet armyworm *Spodoptera exigua*: cloning, characterization and the effect of gene silencing on survival. *BMC Mol Biol*, 11: 65
- Wang M, Weiberg A, Lin FM, et al (2016). Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nat Plants*, 2 (10): 16151
- Wang MB, Abbott DC, Waterhouse PM (2000). A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus. *Mol Plant Pathol*, 1 (6): 347–356
- Weiberg A, Wang M, Lin FM, et al (2013). Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science*, 342: 118–123
- Xin M, Wang Y, Yao Y, et al (2010). Diverse set of microRNAs are responsive to powdery mildew infection and heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biol*, 10: 123
- Yang L, Mu X, Liu C, et al (2015). Overexpression of potato miR482e enhanced plant sensitivity to *Verticillium dahliae* infection. *J Integr Plant Biol*, 57 (12): 1078–1088
- Zhang H, Guo J, Voegelé RT (2012). Functional characterization of calcineurin homologs *PsCNA1/PsCNB1* in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* using a host-induced RNAi system. *PLoS ONE*, 7 (11): e49262
- Zhang L, Hou D, Chen X, et al (2012). Exogenous plant miR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res*, 22: 107–126
- Zhang X, Zhao H, Gao S, et al (2011). *Arabidopsis* Argonaute2 regulates innate immunity via miRNA393*-mediated silencing of a Golgi-localized SNARE gene *MEMB12*. *Mol Cell*, 42: 356–366
- Zhu H, Duan CG, Hou WN, et al (2011). Satellite RNA-derived small interfering RNA satsiR-12 targeting the 3' untranslated region of cucumber mosaic virus triggers viral RNAs for degradation. *J Virol*, 85 (24): 13384–13397
- Zhu QF, Fan L, Liu Y, et al (2013). miR482 regulation of *NBS-LRR* defense genes during fungal pathogen infection in cotton. *PLoS ONE*, 8: e84390

Advances in small RNA regulating plant immune response

ZHANG Zi-Jie^{1,2}, XIAO Wen-Fei², QIU Jie-Ren², XIN Ya², LIU Qin-Po¹, CHAI Wei-Guo², RUAN Song-Lin^{2,*}

¹College of Agriculture and Food Science, Zhejiang Agriculture & Forestry University, Hangzhou 311300, China

²Institute of Biotechnology, Hangzhou Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310024, China

Abstract: Plant small RNAs are not only involved in plant growth and development, but also play an important role in the regulation of plant immune responses. According to origins and precursor structures of small RNAs, they can be classified into microRNAs and small interfering RNAs (siRNAs), with 21–24 nucleotides in length. Differences in biosynthesis and functional mechanisms between them have been found. The infections of pathogens cause changes in expression of endogenous small RNA or pathogen-derived small RNA, and then lead to plant immune response and activate the corresponding RNA interfering (RNAi) pathway. This review focuses on types and synthetic methods of small RNA, small RNA involved in plant immune response to pathogens and RNAi pathways, and application of RNAi technology in the process of plant resistance to diseases and insects. The prospects of functional mechanism of sRNA and RNAi involved in plant immune response are discussed.

Key words: plant small RNA; RNA interfering; immune response; pathogen infection

Received 2017-12-18 Accepted 2018-03-15

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2017YFD0200900), Hangzhou Agricultural Scientific Research and Social Development of Autonomous Design Program (20172015A02), and Hangzhou Major Scientific and Technological Innovation Program (20131812A02).

*Corresponding author (ruansl1@hotmail.com).