

dsRNA 介导的番木瓜环斑病毒 (PRSV) 的抗病性研究

张帆, 姜玲*

(华中农业大学园艺林学学院/教育部园艺植物生物学重点实验室, 国家果树脱毒种质资源室内保存中心, 武汉 430070)

摘要: 以模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和烟草 (*Nicotiana tabacum*) 及 PRSV 寄主植物番木瓜 (*Carica papaya* L.) 作为试验材料, 开展了番木瓜环斑病毒外壳蛋白基因 dsRNA 介导的 PRSV 病原抗性的研究。利用农杆菌介导法将番木瓜环斑病毒外壳蛋白 CP 基因反向重复表达载体 pHellsgate12-CP_{IR} (简称 PHG12-CP_{IR}) 分别转化到烟草和拟南芥中, 获得阳性植株, 并利用渗透法和农杆菌介导的瞬时表达体系将 pHG12-CP_{IR} 载体导入到番木瓜中。对转基因植株进行攻毒试验并分析了其抗病性。在接种 3 ~7 d 内, 在拟南芥和番木瓜上转基因植株的发病情况较轻, 而野生型植株叶片与转基因植株相比, 均表现出不同程度的黄化、皱缩和枯斑等症状。在接种 PRSV 后, 番木瓜和拟南芥转化植株表现症状的叶片的比例与对照相比, 结果显著低于对照, 而在烟草植株上症状表现的差异不明显。在 3 种植物上 RT-PCR 检测结果显示, 在接种番木瓜环斑病毒 PRSV 后, 野生型植株中有高浓度的病毒积累, 而转 pHG12-CP_{IR} 基因植株中几乎没有病毒积累, 推测转 pHG12-CP_{IR} 基因植株中瞬时表达系统已启动 RNAi 机制抑制了 CP 基因的表达。

关键词: 番木瓜环斑病毒; CP 基因; 番木瓜; RNAi; 抗病性; 渗透法

中图分类号: Q432.1

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2011)03-0385-07

Virus-resistance of Papaya Ringspot Virus Mediated by Double-Strand RNA

ZHANG Fan, JIANG Ling*

(College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University/Ministry of Education Key Laboratory of Plant Biology, National Indoor Conservation Center of Virus-free Gemplasms of Fruit Crops, Wuhan 430070, China)

Abstract: Tobacco (*Nicotiana tabacum*), *Arabidopsis thaliana*, and host papaya (*Carica papaya* L.) of PRSV were used as model plant materials to testing whether RNAi could mediate resistance to papaya ringspot virus (PRSV). The agrobacterium was harbored with pHellsgate12-CP_{IR} containing structured inverted sequences of the CP gene of PRSV, where were transformed into the tobacco and *Arabidopsis*. We also conducted an *Agrobacterium*-mediated transient expression experiment by infiltration in papaya. The three transgenic plants inoculated with PRSV were tested for resistance to PRSV. After PRSV challenge-inoculation for 3 to 7 days, leaves of the wild type plants displayed symptoms of necrosis, wrinkling and/or chlorosis, and the scale of the abnormal leaves in the transgenic plants was significantly lower than that of the wild type when the PRSV were inoculated in papaya and *Arabidopsis* separately. However, the difference in symptoms was not significant in transgenic tobacco and the control wild plant. We carried out a RT-PCR experiment on the three kinds of plants. The expression of CP mRNA was detected in the wild type plants infected with PRSV, but not in the transgenic plants. These results suggest that the transgenic plants may induce the RNAi process to resist PRSV.

Key words: Papaya ringspot virus; CP gene; *Carica papaya*; RNAi; Resistance; Infiltration

收稿日期: 2010-07-15, 修回日期: 2011-06-11。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30571277, 30771477)。

作者简介: 张帆(1985-), 男, 硕士, 从事植物生物技术研究。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: jiangling@mail.hzau.edu.cn)。

番木瓜环斑病毒 (papaya ringspot virus, PRSV) 是影响番木瓜产业的最重要的一种病毒,由它导致的番木瓜环斑病毒病 (papaya ringspot disease, PRSD) 是一种分布最广、危害最严重的番木瓜病害,现已成为制约番木瓜生产的一种世界性的严重病害。传统的一些抗病毒策略往往收效甚微。随着植物基因工程的发展,以外壳蛋白基因介导的抗病性研究为防治植物病毒病带来了新的途径^[1,2]。随着科学技术的发展和对 PRSV 的深入研究,以基因工程为主要研究手段的番木瓜抗病毒研究显示出巨大的潜力。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是多种生物体内由双链 RNA 介导的同源 mRNA 降解现象。植物体天然的 RNAi 系统并不能起到完全或较高水平的抵御某种病毒侵染的作用。如果人为地将某种病毒的某一序列设计成双链结构,导入植物体,使之表达可诱发 RNAi 的双链 RNA,通过诱导的 RNAi,强化植物体内天然的 RNAi 抗病毒机制,就有可能获得较高抗性的转基因植物。dsRNA 介导的抗病性是近来发现并得到广泛应用的一种有效策略。由于 dsRNA 介导的抗病性具有一些无可比拟的优点 (如单拷贝也能产生高抗的转基因植株;短片段的核酸序列也能够起到高效抗病性;入侵的病毒,其 RNA 会迅速被降解,不需要转入的病毒基因表达产生蛋白质产物等),使得这种抗病毒的策略具有广阔的应用价值^[3]。

Eamens 等^[4]利用大豆矮化病毒 (soybean dwarf virus, SDV) CP 基因 (外壳蛋白基因, coat protein gene) 构建的 hpRNA 转化大豆胚状体,转基因 T2 代植物仍保持病毒抗性。竺晓平等^[5]利用马铃薯 Y 病毒脉坏死株系外壳蛋白基因的 hpRNA 表达载体转化烟草,正向重复转基因植株不表现抗病,而反向重复 (IR) 结构的转基因植株表现高度抗性。因此,研究 CP 基因发夹 RNA 的沉默效果,对于番木瓜的抗病毒研究有着重要的意义。

众多研究表明:转 CP 基因植物的抗病性一般可以得到稳定遗传,而且具有较小的潜在危险性,被认为是最有应用潜力的途径之一。主要原因如下:第一,外壳蛋白基因在转基因植物中可以得到稳定遗传;第二,它具有抵抗特异性病毒的能力,对亲缘关系较远的病毒不具有抗性;第三,抗病能力与转基因植物体内的蛋白产物的表达量成正比。

虽然 CP 基因介导的抗病性已经获得了很大的

成功,但是仍存在一些问题:一是 CP 基因介导的抗病性主要是在病毒侵染的早期,表现在只是延迟发病,当存在高接种量或重复接种时则会破坏其抗性;二是利用 CP 基因介导的抗病性具有潜在的危险性,因为外壳蛋白对其它病毒的包壳作用可能会导致非蚜传病毒变为蚜传病毒^[6]。因此,研究人员担心导入的基因可能与植物基因重组导致产生新的病毒。

目前,已成功应用的抗病毒的基因主要包括外壳蛋白基因^[7]、复制酶基因^[8,9]、移动蛋白基因和病毒核酸等^[10]。同时由于在植物中诱发 RNAi 沉默过程能有效抵御病毒的入侵,因此构建病毒基因的反向重复结构并将其导入到受体材料中,能够获得高抗该病毒的植株^[11]。

本研究将实验室已经构建好的含有 CP 基因的反向重复表达载体在模式植物烟草和拟南芥中进行了遗传转化,并利用渗透法建立了番木瓜的农杆菌瞬时表达体系。同时对转化植株进行攻毒实验,监测转基因植物的抗病性以及抗病机制。比较 PRSV 病毒在其寄主植物和非寄主植物上 RNAi 效应的差异。通过强化植物体的 RNAi 抗病效应,为培育抗 PRSV 的番木瓜品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 哥伦比亚 0 号由华中农业大学胡春根教授提供;烟草 (*Nicotiana tabacum*) k236 由华中农业大学陈守文教授提供;番木瓜 ‘夏威夷’ (*Carica papaya*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α 、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 GV3101、质粒 pHellsgate12-CP_{IR} (简称 pHG12-CP_{IR}) (结构见图 1) 均由国家果树脱毒种质资源室内保存中心脱毒研究室提供。转化 pHG12-CP_{IR} 的烟草植株由本研究室硕士生王莉转化,作者进一步通过组织培养继代培养而成。感染番木瓜环斑病毒的番木瓜病叶样品由广东省农业科学院果树研究所提供。

PCR 试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司,植物 RNA 提取 Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司,RT-PCR 试剂盒购自北京 Bio Dev 生物技术有限公司,其他常用试剂为国产分析纯。番木瓜 CP 基因 P5、P4 和 T2 引物序列根据文献^[12]中测定

的序列合成。*NPTII* 基因的引物根据 pBI121 载体序列合成。*ACTIN_{Nt}*、*ACTIN_{Pa}* 和 *ACTIN_{At}* 基因的引物根据代晓燕等的方法^[13]合成(表 1)。引物合成由上海生工生物工程技术有限公司完成。

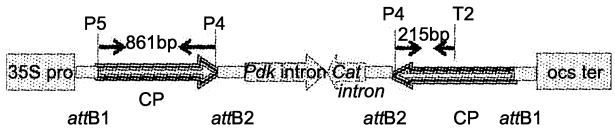


图 1 pHellsgate12-CP_{IR} 干扰表达载体示意图
Fig. 1 Sketch map of pHellsgate12-CP_{IR} interference expression vector

表 1 PCR 引物及序列
Table 1 PCR primers and their sequences

基因 Gene	引物代号 Primer code	序列 Sequence (5' to 3')
CP	P5(+)	atgtccaagaatgaagct
	P4(-)	ttagttgcgcataccaggag
	T2(+)	ctcgctagatatgcttcgatttc
NPTII	npt II (+)	ctctgatgccgccgtgtcc
	npt II (-)	gcccaatagcagccagtccc
ACTIN _{Nt}	actin _{Nt} (+)	ggtagctccacctgagaggaagt
	actin _{Nt} (-)	gcctttgcaatccacatctgt
ACTIN _{Pa}	actin _{Pa} (+)	ttgattttgagcaggagctga
	actin _{Pa} (-)	tgagtgtatggctggaagagaac
ACTIN _{At}	actin _{At} (+)	atcgctgaccgtatgag
	actin _{At} (-)	tgagggaagcaagaatg

1.2 方法

1.2.1 植物总 RNA 的提取

总 RNA 的提取参照 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂说明书进行, RNA 于 -70℃ 保存。操作在超净工作台上进行, 试剂用 DEPC 水配制。

1.2.2 植株接种番木瓜环斑病毒

参考魏军亚¹⁾ 等方法并做适当改进。取含有番木瓜环斑病毒的番木瓜叶样适量, 按照 1: 10 (W/V) 的比例加入 PBS 磷酸缓冲液, 充分研磨。将匀浆液加入到 1.5 mL 离心管中, 6000 r/min, 4℃ 冷冻离心 10 min。冰上放置, 取上清液作为病毒接种液。选取 4~6 叶期的健康植株, 在叶正面撒上少量石英砂, 由叶脉向叶尖顺势轻轻摩擦整个叶片表面。而后滴加接种液并将接种液在叶片表面涂抹均匀。接种液固定为 10 μL, 接种结束后立即用蒸馏水冲洗接种叶表面。同时设置不接种任何液体 (CK) 和接种 PBS 缓冲液两种对照处理。将接种后

的植株移入温室中培养, 攻毒处理后 10 d 时观察表型变化并做分析。

1.2.3 RT-PCR

RT 反应采用 Bio Dev 通用 RT-PCR 试剂盒 (M-MLV) 说明书进行。将配制的反应体系在 37℃ 温浴反应 2 h, 随后 95℃ 热反应 5 min 后于 -20℃ 保存。PCR 反应采用 Bio Dev 银牌快速 Taq 酶 (SF-Taq) 说明书进行。PCR 反应的程序如下: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 20 s, 58℃ 退火 10 s, 72℃ 延伸 15 s, 33 个循环后 72℃ 延伸 2 min。反应完毕后, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 农杆菌渗入试验

挑取含有 pHG12-CP_{IR} 载体的农杆菌 GV3101 单菌落于 ΨB 液体培养基 (含 100 mg/L Rif, 100 mg/L Spec) 中, 28℃ 摇床培养至对数生长期, 离心收集菌体。将菌体重悬于含 10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L 2-(N-吗琳)-乙基磺酸 (MES, pH 5.6) 和 150 μmol/L 乙酰丁香酮 (AS) 的缓冲液中。调整菌液浓度使其 OD₆₀₀ 在 1.0 左右, 室温静置放置 2~3 h。用 1 mL 注射器针头将 5~6 叶期番木瓜的两片子叶下表皮轻轻刺 2~3 个孔, 并在破处用无针头的注射器针管靠压力将菌液注入番木瓜子叶中, 同时以 GV3101 空载体和不经浸润的番木瓜作为对照。每种处理接种 6~7 株苗, 重复 3 次。将不同处理番木瓜幼苗置于 28℃ 和 16 h 光照/8 h 黑暗条件下培养。4 d 后进行攻毒试验。

1.2.5 拟南芥遗传转化

参考 Clough 等的方法^[14] 并做适当改进。选取长势良好且已抽薹的拟南芥植株, 除去已开的花和荚, 转化前一夜浇足水。挑取含有 pHG12-CP_{IR} 载体的农杆菌 GV3101 单菌落于含有相应抗生素的 ΨB 培养基中 (含 100 μg/mL Rif 和 100 μg/mL Spec), 28℃ 摇床培养过夜。取 1 mL 菌液加入到 50 mL ΨB 培养基中, 28℃ 摇床至 OD₆₀₀ 在 1.2~1.6 之间。菌液在 6000 r/min 下离心 5 min。倒去上清后用 MS 渗透培养基重悬菌体至 OD₆₀₀ 约为 0.8。侵染之前加入 0.5% 的 silwet-77 并充分混匀。将植株顶端部分全部浸入菌液中, 侵染 10~15 s。将侵染后的植株避光过夜, 第 2 天转入正常生长环境下。每隔 3 d 左右重复侵染一次, 共重复 3 次。

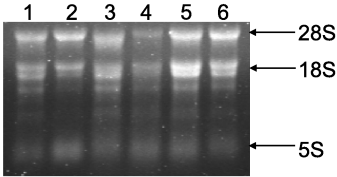
1) 魏军亚. 番木瓜花粉管转基因技术及 RNA 介导广谱抗病性的初步研究. 华南热带农业大学中国热带农业科学院博士后工作报告, 2006.

3~5 周后收取种子做筛选。选取 5~6 叶期的‘夏威夷’番木瓜实生苗作为试验对象,对子叶进行含有目的载体的农杆菌瞬时表达实验,同时设置不接种农杆菌、接种农杆菌 GV3101 和接种农杆菌 pHG12-CP_{IR} GV3101 三个处理间对照,每个处理进行 6~7 个生物学重复。农杆菌接种处理完后对番木瓜植株进行保湿处理,在接种农杆菌 4 d 后对子叶进行攻毒试验,接种番木瓜环斑病毒,接种病毒 7 d 后对子叶上部的顶生新叶进行症状观察并作分析。在烟草上,对 5~6 叶期时的 pHG12-CP_{IR} 转基因烟草和野生型烟草进行攻毒试验。同时设置不接种任何液体(CK)和接种 PBS 缓冲液两种对照处理。保证接种病毒的操作一致,并保证 6~7 个生物学重复。在拟南芥上,选取播种 30 d 的 pHG12-2 T2 代纯合阳性苗和野生型拟南芥的轮状叶进行攻毒试验,接种方法同烟草。同时设置不接种任何液体(CK)和接种 PBS 缓冲液两种对照处理。7 d 后观察表型并作分析。选取代表性的植株进行照相。

2 结果

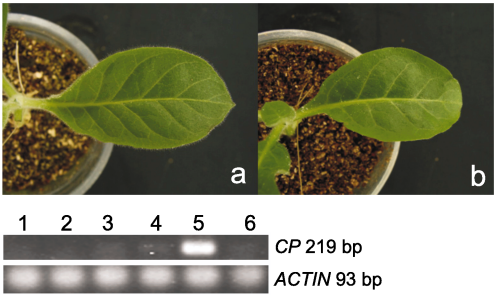
2.1 pHG12-CP_{IR} 转基因烟草的抗病毒分析

接种 3 d 后观察表型并提取 RNA 做分析(图 2)。表型结果显示,处理对照组之间,接种叶并无明显表型差异(见图 3:a 和 b,表 2,)。但 RT-PCR 结果显示,野生型烟草和转 pHG12-CP_{IR} 基因烟草在接种 PRSV 病毒后差异明显,野生型烟草中有高浓度的病毒 CP mRNA 的积累;而转 pHG12-CP_{IR} 基因烟草中几乎没有病毒 CP mRNA 的积累,可以推测转 pHG12-CP_{IR} 基因烟草中已启动 RNAi 机制抑制了 CP 基因的表达(图 3)。



1,3,5. 分别为野生型烟草未接种、接种 PBS 和接种 PRSV 的叶片提取的总 RNA; 2,4,6. 分别为转 pHG12-CP_{IR} 基因烟草未接种、接种 PBS 和接种 PRSV 的叶片提取的总 RNA。
1,3,5. The total RNA of WT tobacco leaves not inoculated, inoculated with PBS and inoculated with PRSV; 2,4,6. The total RNA of pHG12-CP_{IR} transformed tobacco leaves not inoculated, inoculated with PBS and inoculated with PRSV.

图 2 烟草叶片总 RNA 变性凝胶电泳



a, 转基因烟草植株接种 PRSV 病原; b, 野生型烟草植株接种 PRSV 病原。1,3,5. 分别为野生型烟草未接种、接种 PBS 和接种 PRSV 的叶片; 2,4,6. 分别为 pHG12-CP_{IR} 基因烟草未接种、接种 PBS 和接种 PRSV 的叶片。
a, Transgenic tobacco plant inoculation with PRSV; b, Wild plant inoculation with PRSV. 1,3,5. WT tobacco leaves not inoculated, inoculated with PBS and inoculated with PRSV; 2,4,6. pHG12-CP_{IR} transformed tobacco leaves not inoculated, inoculated with PBS and inoculated with PRSV. The ACTIN gene was used as the internal control.

图 3 病原接种后的表现及 RT-PCR 检测烟草接种叶片中 PRSV CP 基因的表达

Fig.3 Symptoms after inoculation of PRSV and RT-PCR detection of CP gene expression of PRSV in inoculated tobacco leaves

2.2 农杆菌介导的番木瓜瞬时表达体系的抗病毒分析

结果发现:未接种 PRSV 的所有处理无明显表型变化,说明阴性对照良好。而不接种农杆菌或接种农杆菌 GV3101 和接种农杆菌 pHG12-CP_{IR} GV3101 在接种 PRSV 后表型差异明显,前二者顶生新叶产生明显的枯斑且叶片有皱缩、褪绿的现象,而后者和阴性对照相比无明显表型变化,数据统计结果见表 2。约有 90% 的野生型植株在接种 PRSV 病原之后,表现出黄化、枯萎和扭曲的症状,而转化植株表现正常(图 4:a, b)。RT-PCR 结果显示,不接种农杆菌或接种农杆菌 GV3101 和接种农杆菌 pHG12-CP_{IR} GV3101 在接种 PRSV 后差异明显,不接种农杆菌或接种农杆菌 GV3101 的番木瓜体内有高浓度的病毒 CP mRNA 的积累;而接种农杆菌 pHG12-CP_{IR} GV3101 的番木瓜体内几乎没有病毒 CP mRNA 的积累,说明接种农杆菌 pHG12-CP_{IR} GV3101 的番木瓜体内已启动 RNAi 机制抑制了 CP 基因的表达(图 4)。

2.3 转 pHG12-CP_{IR} 基因拟南芥的抗病毒分析

对上部非接种轮状叶进行表型观察发现,未接种 PRSV 的非接种轮状叶无明显表型差异,说明阴性对照良好。而接种了 PRSV 的野生型拟南芥的非

Fig.2 Denaturing gel electrophoresis of total RNA from tobacco leaves

表 2 转基因植物接种 PRSV 病原后的形态变化分析

Table 2 Analysis of modality characteristic in transgenic plant after inoculated by PRSV pathogen

植物 Plant	症状 Symptoms	处理 Treatments	表现症状植株数/接种数 Plant number of represent symptoms/ inoculated plant number	接种 PRSV 后表现症状植株的百分数(%) Percentage of represent symptoms after inoculated with PRSV in plants
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	接种叶表现黄化 Etiolation shown in the inoculated leaves	WT pHG12- <i>CP</i> _{IR}	1/6, 1/7, 1/7 1/6, 1/6, 1/7	15.1a* 15.8a
番木瓜 <i>Carica papaya</i> L.	顶生新叶表现皱缩, 有枯斑 Crimple and fade shown in the Apex leaves	WT GV3101 pHG12- <i>CP</i> _{IR}	6/6, 6/7, 6/7 5/6, 5/7, 6/7 1/6, 0/7, 1/7	90.0 a 79.0 a 10.3 b
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	上部非接种叶表现黄化斑驳 Etiolation and mottled shown in the non-inoculated leaves	WT pHG12- <i>CP</i> _{IR}	4/6, 4/7, 5/7 1/6, 2/7, 2/7	65.0 a 24.5 b

* a,b 表示差异显著性($p < 0.05$)。
* a,b indicate significant differences($p < 0.05$)。

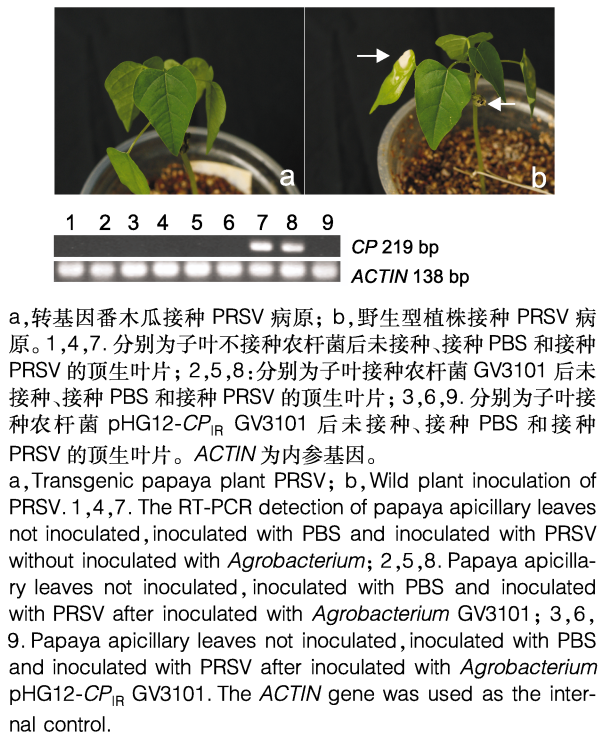


图 4 病原接种后的表现及 RT-PCR 检测番木瓜顶生新叶中 PRSV CP 基因的表达

Fig. 4 Symptoms after inoculation of PRSV inoculation of PRSV and RT-PCR detection of *CP* gene expression of PRSV in papaya apicillary leaves

接种轮状叶相比对照有叶片变黄的特征,而接种了 PRSV 的转基因拟南芥的非接种轮状叶相比对照无明显表型变化,数据统计结果见表 2。RT-PCR 结果显示,野生型拟南芥和转 pHG12-*CP*_{IR} 基因拟南

芥在接种 PRSV 病毒后差异明显,野生型拟南芥中有高浓度的病毒 *CP* mRNA 的积累;而转 pHG12-*CP*_{IR} 基因拟南芥中几乎没有病毒 *CP* mRNA 的积累,说明转 pHG12-*CP*_{IR} 基因拟南芥中已启动 RNAi 机制抑制了 *CP* 基因的表达(图 5)。

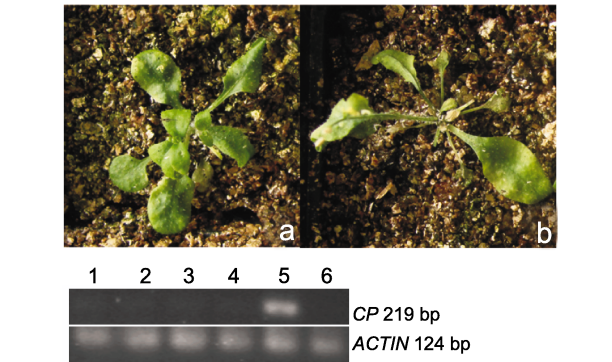


图 5 病原接种后的表现及 RT-PCR 检测拟南芥非接种轮状叶中 PRSV 病毒 CP 基因的表达

Fig.5 Symptoms after inoculation of PRSV and RT-PCR detection of *CP* gene expression of PRSV in uninoculated *Arabidopsis* rosette leaves

植株的接种试验反应出不管是稳定转化的转基因烟草和拟南芥,还是农杆菌介导的 pHG12- CP_{IR} 瞬时表达的番木瓜转化苗,在接种 PRSV 病原的情况下,从分子水平分析,转化植株都表现出了明显的沉默效果。

2.4 转基因和野生型植株接种 PRSV 的症状变化

从烟草接种试验可以看出, pHG12- CP_{IR} 转基因植株接种 PRSV 后的表现症状与野生型植株相比表型无明显的差异,黄化症状苗各占 15.1% 和 15.8%。接种 PRSV 后,番木瓜瞬时转化植株的顶生新叶表现皱缩,表现枯斑症状的植株比例为 10.3%,转化农杆菌 GV3101 的对照有 79.0% 表现病症,而野生型植株有 90.0% 表现病症。拟南芥接种试验显示,接种 PRSV 后,转基因植株表现症状和野生型表现症状的植株分别占 65.0% 和 24.5%,统计分析显示其差异显著 ($p < 0.05$)。从形态上看,转基因番木瓜和转基因拟南芥植株在病原浸染后,出现不正常叶片的比例显著下降。

3 讨论

农杆菌介导的基因瞬时表达体系是一种简单、有效且快速分析基因表达的研究方法。这种方法的优势是不需要产生转基因的植株就能够生产许多需要的异源蛋白质^[15-17]。这种瞬时表达体系常常被用来鉴定一些未知的抑制 RNA 沉默的抑制子或是一些未知基因的功能分析等^[18,19]。基因瞬时表达体系相比于稳定表达具有很多方面的优点,其中最大的优点就是简便且易于操作。

牛颜冰等^[20]发现,瞬时表达黄瓜花叶病毒复制酶基因和番茄花叶病毒移动蛋白基因的融合基因的 dsRNA 能够有效阻止相关病毒的侵染。赵明敏等^[21]发现瞬时表达 TMV 外壳蛋白基因的 dsRNA 能够影响 TMV 的侵染。上述研究结果都表明,在植物体内表达 dsRNA 都能够引起相关基因的沉默。

在本研究中,利用瞬时表达 dsRNA 的反向重复载体接种番木瓜来降解 PRSV 的 RNA。通过含有 PRSV 的汁液摩擦接种经过农杆菌浸润的番木瓜子叶表明,经过农杆菌浸润的植株对 PRSV 的侵染产生了抗性,我们认为这是由于在番木瓜体内导入了由反向重复载体转录形成的 dsRNA 启动了 RNA 沉默机制的结果,即瞬时表达 CP 基因反向重复载体能够形成 dsRNA,从而有效抑制了 PRSV 对番木

瓜植株的侵染。本试验的结果与前人的研究表现出相似的效果^[21,22]。另外,利用农杆菌瞬时表达体系能将重组的载体快速导入到植株的细胞中去,这样可以快速检测所构建的重组载体是否具有对病毒的侵染产生干扰的能力,从而可以快速预测所构建的重组载体是否具有抗病毒的沉默效果,这为转基因植株的稳定表达提供了一定的理论依据。在经农杆菌浸润后的番木瓜子叶上接种病毒,未接种反向重复载体的番木瓜体内,PRSV 病毒会由子叶传递到真叶上,说明 PRSV 能够在番木瓜上进行转移;而接种反向重复载体的番木瓜体内,PRSV 病毒不会由子叶传递到真叶上。说明农杆菌瞬时表达体系在番木瓜上得到了运用并且浸润植株体内已启动了 RNAi 机制抑制了 CP 基因的表达。

在进行基因功能分析时,常常会用到模式植物作为转基因受体材料,因为模式植物的转化系统相对成熟,容易得到转基因植株,但对其进行病毒接种试验时,往往会受到病原寄主范围的影响。在本试验中,番木瓜 PRSV 在接种到烟草、拟南芥和番木瓜上时,就表现出寄主和非寄主植物的差别。番木瓜环斑病毒属于马铃薯 Y 病毒科 Potyviridae、马铃薯 Y 病毒属 *Potyvirus*,该病毒的寄主范围窄,PRSV-P 可自然侵染番木瓜和葫芦,用实验方法可传给藜科和葫芦科的 15 种双子叶植物,PRSV-W 能够侵染葫芦科 11 个属和藜科 2 个属的 38 种植物^[23]。由于烟草本身不是 PRSV 的寄主植物,在 PRSV 侵染下,烟草表现的症状明显没有在拟南芥和番木瓜上敏感。可能烟草植株自身产生免疫机制或自身具有较强的忍耐力,因而在表型上变化不大。采用番木瓜作转化受体,受病毒侵染时,形态特征更明显。但在 mRNA 水平上分析,番木瓜、烟草和拟南芥均表现出 phRNA 介导的沉默效应。因此,观察 RNAi 的效果,要从形态特征和分子不同的角度进行综合分析。

依赖真空渗透的瞬时表达系统是 1997 年由 Kapila 等发展完善的,该表达系统外源蛋白 3~5 d 即能获得高水平的表达,周期短,无环境安全性问题,操作容易,设备简单,目前利用农杆菌真空渗透法已在植物中表达了许多外源蛋白^[24-26]。李玉玺等^[27]研究指出,用农杆菌真空渗透法在烟草中瞬时表达人的酸性成纤维细胞生长因子在真空渗透后 4 d,外源基因获得最高水平的表达。因此,基因瞬时表达的高峰是有规律可寻的。

因此,本研究为快速验证 phRNA 的沉默效果提供了可借鉴的方法。同时也为建立有效的番木瓜抗病毒基因工程提供了依据。

参考文献:

- [1] 郭兴启,范国强,尚念科. 植物抗病毒基因工程育种策略及其进展[J]. 生命科学研究,2004(2):112-117.
- [2] Tougou M, Furutani N, Yamagishi N, Shizukawa Y, Takahata Y, Hidaka S. Development of resistant transgenic soybeans with inverted repeat-coat protein genes of soybean dwarf virus[J]. *Plant Cell Rep*,2006,25: 1213-1218.
- [3] Voinnet O. RNA silencing as a plant immune system against virus[J]. *Trends in Genetics*,2001,17(8): 449-459.
- [4] Eamens A, Wang M B, Smith N A, Waterhouse P M. RNA Silencing in Plants: Yesterday, Today, and Tomorrow[J]. *Plant Physiol*,2008,147: 456-468.
- [5] 竺晓平,朱常香,宋云枝,温孚江,刘红梅,李向东. CP 基因 3'端短片段介导的对马铃薯 Y 病毒的抗性[J]. 中国农业科学,2006,39(6): 1153-1158.
- [6] Hammond J, Dienelt M M. Encapsidation of potyviral RNA in various forms of transgenic coat protein is not correlated with resistance in transgenic plants[J]. *Phytopathology*,1980,70: 1028-1032.
- [7] Zrachya A, Kumar P P, Ramakrishnan U, Levy Y, Loyter A, Arazi T, Lapidot M, Gafni Y. Production of siRNA targeted against TYLCV coat protein transcripts leads to silencing of its expression and resistance to the virus[J]. *Transgenic Re*,2007,16(3): 385-398.
- [8] Sanford J C, Johnston S A. The concept of parasite-derived resistance: driving resistance genes from the parasite owe genome[J]. *J Theor Biol*,1985,113: 395-405.
- [9] Palukaitis P, Zaitlin M. Molecular and Genetic Perspective. Plant-Microbe Interaction [M]// Kosuge T, Nester E W, eds. New York: Macmillan, 1984: 420-429.
- [10] 庞俊兰. 植物抗病毒基因工程研究进展[J]. 海淀走读大学学报,2002,57(1): 65-69.
- [11] Waterhouse P M, Helliwell C A. Exploring plant genomes by RNA induced gene silencing[J]. *Nat Rev Genet*,2002,4: 29-38.
- [12] 姜玲,秦长平,伏卉. Gateway™ 系统快速构建番木瓜环斑病毒 CP 基因反向重复序列表达载体[J]. 农业生物技术学报,2008,16(3): 526-529.
- [13] 代晓燕,苏以荣,魏文学,等. 烟草 *Nt-syr1* 基因实时荧光定量 PCR 检测方法[J]. 中国烟草科学,2008,29(3): 20-24,28
- [14] Clough S J, Bent A F. Floral dip: a simplified method for *agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant J*, 1998, 16: 735-743.
- [15] Fiseher R, Stoger E, Sehillberg S, *et al.* Plant-based production of bio-pharmaceuticals[J]. *Curr Opin Plant Biol*,2004,7: 152-158.
- [16] Fiseher R, Vaquero M C, Saek M, *et al.* Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants [J]. *Biotechnol Appl Biochem*,1999,30: 113-116.
- [17] Hom M E, Woodard S L, Howard J A. Plant molecular farming: systems and products [J]. *Plant Cell Rep*,2004,22: 711-720.
- [18] Qu F, Ren T, Morris T J. The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene-silencing at an early initiation step [J]. *J Virol*, 2003, 77: 511-522.
- [19] Thomas C L, Leh V, Lederer C, *et al.* Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana* [J]. *Virology*, 2003, 306: 33-41.
- [20] 牛颜冰,于翠,张凯,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[J]. 农业生物技术学报,2004,12(4): 484-485.
- [21] 赵明敏,安德荣,黄广华,何祖华,陈江野. 瞬时表达靶向 TM V 外壳蛋白基因的 siRNA 能干扰病毒侵染[J]. 植物病理学报,2006,36(1): 35-40.
- [22] 邱初,陶刚,邱义彬,李奇科,朱英,迟胜起,刘作易. 瞬时表达比较 2 种不同的 RNAi 载体的干涉效果[J]. 植物病理学报,2010,40(5): 543-547.
- [23] Yeh S D, Gonsalves D. Evaluation of induced mutants of papaya ringspot virus for control by cross protection[J]. *Phytopathology*,1984,74(9): 1086-1091.
- [24] Olivier V, Susana R, Pere M, *et al.* An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus[J]. *Plant J*,2003,33(5): 949-956.
- [25] Valentine N, Galina E, Hyungil L, *et al.* Highly etiol-transient expression of functional recombinant antibodies in lettuce[J]. *Plant Science*,2005,169(3): 433-438.
- [26] Wang M, Li Q R. Transient expression of strictosidine synthase in tobacco leaves by vacuum infiltration[J]. *Acta Biochim Biophys*,2002,34(6): 703-706.
- [27] 李玉玺,刘晶莹,伏秀清,杨涛,肖乃仲,朱筱娟,王兴智. 用农杆菌真空渗透法在烟草中瞬时表达人酸性成纤维细胞生长因子[J]. 高技术通讯,2007,17(4): 430-434.