

植物非细胞自主性 RNAi 及其应用研究进展

李 琳¹, 吴风光¹, 何结旺¹, 王豹祥¹, 张明月², 邱立友^{2*}

(1. 湖北中烟工业有限责任公司, 湖北 武汉 430051;

2. 河南农业大学 生命科学院, 农业部农业微生物酶工程重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 非细胞自主性 RNAi 是发生于那些非应用或非产生 dsRNA 的细胞或组织中的 RNAi, 包括系统性 RNAi 和环境 RNAi。系统性 RNAi 是沉默现象从一个细胞扩散到另一个细胞或从一个组织扩散到另一个组织的过程, 环境 RNAi 是细胞从环境中吸收 dsRNA 而触发的 RNAi。近年来, 植物非细胞自主性 RNAi 研究取得了较大进展, 就其机制及应用进行了评述, 首次提出在植物中也有环境 RNAi 存在。

关键词: 植物; 非细胞自主性 RNAi; 系统性 RNAi; 环境 RNAi; 机制; 应用

中图分类号: Q819 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)11-0001-04

Research Progress of Non-cell-autonomous RNAi and Its Application in Plants

LI Lin¹, WU Feng-guang¹, HE Jie-wang¹, WANG Bao-xiang¹, ZHANG Ming-yue², QIU Li-you^{2*}

(1. China Tobacco Hubei Industrial Co., Ltd., Wuhan 430051, China;

2. Ministry of Agriculture Key Laboratory of Enzyme Engineering of

Agricultural Microbiology, College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Non-cell-autonomous RNAi takes place in the cell or tissue in which dsRNA is not applied or self-generated, including systemic RNAi and environmental RNAi. Systemic RNAi is that RNA silencing can spread from cell to cell or spread from one tissue to another tissue. In addition, cells can take up dsRNA from the environment and trigger RNAi which is named environmental RNAi. In recent years, the research of non-cell-autonomous RNAi in plants has made great progress. The mechanism of non-cell-autonomous RNAi and its application in plants are reviewed in this paper. To our knowledge, we proclaim that environmental RNAi occurs in plants for the first time.

Key words: plant; non-cell-autonomous RNAi; systemic RNAi; environmental RNAi; mechanism; application

自 20 世纪 90 年代中后期发现 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 现象以来, RNAi 技术在短短十几年内得到了蓬勃发展, 被广泛应用于真核生物的基因功能鉴定、基因敲除、病虫害控制等^[1-2]。RNAi 可分为细胞自主性 RNAi (cell-autonomous RNAi) 和非细胞自主性 RNAi (non-cell-autono-

mous RNAi)。细胞自主性 RNAi 是人们了解最多的一种 RNAi 现象, 其沉默过程仅限于引入或表达 dsRNA 的细胞, 且仅限于单个细胞, 目前其机制已经比较清楚。非细胞自主性 RNAi 则是指发生于那些非引入或非表达 dsRNA 的细胞或组织中的 RNAi, 包括系统性 RNAi (systemic RNAi) 和环境

收稿日期: 2012-06-28

基金项目: 湖北中烟工业有限责任公司科技项目 (2011YS051-001)

作者简介: 李 琳 (1979-), 女, 河南焦作人, 工程师, 硕士, 主要从事烟草原料加工及评价工作。E-mail: lilin@hbtobacco.cn

* 通讯作者: 邱立友 (1963-), 男, 河南信阳人, 教授, 博士, 主要从事分子生物学研究。E-mail: qliyou@henau.edu.cn

RNAi (environmental RNAi)。系统性 RNAi 是指 RNA 沉默从一个细胞扩散到另一个细胞或从一个组织扩散到另一个组织的过程,所以,系统性 RNAi 只能发生于多细胞生物;环境 RNAi 是指细胞从环境中吸收 dsRNA 而触发的 RNAi,既可以发生于多细胞生物,也可以发生于单细胞生物。在多细胞生物中,环境 RNAi 发生之后可接着发生系统性 RNAi,非细胞自主性 RNAi 发生之后也可接着发生细胞自主性 RNAi^[3]。

近年来,植物非细胞自主性 RNAi 研究取得了较大进展,就其机制及应用进行评述,并首次提出植物环境 RNAi 的概念。

1 植物非细胞自主性 RNAi 现象的发现

植物非细胞自主性 RNAi 现象最早发现于烟草中。用带有绿色荧光蛋白(GFP)报告基因的农杆菌悬浮液渗透处理转 GFP 基因的烟草叶片,起初只有一小部分渗透区域的 GFP 表达被沉默,18 d 后上部叶片中 GFP 的表达全被沉默^[4]。一些植物嫁接试验进一步证实了非细胞自主性 RNAi 及 RNAi 扩散现象。在烟草^[5]、番茄^[6]、黄瓜^[7]和向日葵^[8]等嫁接时,沉默信号可从发生沉默现象的砧木传递到非沉默的接穗中,但不能从沉默的接穗传递到非沉默的砧木中,沉默信号的传递是单方向的。经传递发生沉默的组织能够稳定地保持沉默,但不能遗传^[9]。此外,通过直接轰击 dsRNA 或 siRNA (small interfering RNA)来处理叶片也可诱发非细胞自主性 RNAi^[10-11]。

2 细胞间转运的系统性 RNAi

植物相邻细胞间 RNAi 扩散存在 2 种明显不同的机制,分别是细胞间转运的系统性 RNAi 和长距离转运的系统性 RNAi。细胞间转运的系统性 RNAi 包括 2 个连续的过程:局部沉默扩散和大范围沉默扩散。

2.1 局部沉默扩散

局部沉默扩散和大范围沉默扩散的差别主要是,前者不需要 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RDR)参与,而后者需要。由于没有 RDR 参与,局部沉默扩散仅限于从沉默的起始细胞通过胞间连丝扩散至周围的 10~15 个细胞,沉默信号没有被 RDR 扩增。在绝大多数植物中,胞间连丝是沉默因子在细胞间转运的唯一通道,但在拟南芥中发现,成熟的保卫细胞或母子边界细胞也可以转运沉默因子^[12-15]。局部沉默扩

散中有 DCL4 (一种特异性核酸内切酶 Dicer 类似物)及其产物 21 nt siRNA 和与内源目标基因结合的 AGO1 (Argonaute 家族蛋白)参与,而没有 24 nt siRNA 参与^[16-17]。DCL4 与 DRB4 (双链 RNA 连接蛋白 4)共同将引入植物的 dsRNA 进行剪切,产生 21 nt 长的初级 siRNA, siRNA 由 HEN1 (siRNA 甲基化酶 1)介导的甲基化加以稳定,再上载至 RNA 诱导的沉默复合物(RNA induced silencing complex, RISC), RISC 含有 AGO1 蛋白降解目标 mRNA。21 nt siRNA、dsRNA 以及异常 mRNA 等沉默信号通过胞间连丝传递至周围 10~15 个细胞,提高了沉默效力。另外,在供体细胞和受体细胞中,沉默缺陷蛋白 4 (SDE4)和依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶 IV 的最大亚基 (NRPD1a)的复合体 SDE4/NRPD1a、依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 2 (RDR2)和染色质重塑因子蛋白 (CLSY1)可能参与了这些沉默信号的修饰^[1]。沉默信号的数量可能是限制沉默进一步扩散的重要因素^[18]。

2.2 大范围沉默扩散

当细胞间沉默扩散超出 15 个细胞时,即是大范围沉默扩散。植物中大范围沉默扩散需要依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 6 (RNA-dependent RNA polymerases 6, RDR6)和 RNA 解旋酶 SDE3 (RNA helicase-like protein)参与。因此,大范围沉默扩散过程中有 RNA 的扩增,即在 RDR6、SDE3 和卷曲蛋白 SGS3 作用下通过 5'-3' 和 3'-5' 进行双向 RNA 的扩增,前者是引物依赖的 RNA 合成,后者是非引物依赖的 RNA 合成。新合成的 dsRNA 由 DCL4 剪切产生次级 siRNA,次级 siRNA 与初级 siRNA 不发生重叠反应。沉默信号的持续扩增可能是大范围沉默扩散发生的主要机制^[16,19]。

3 长距离转运的系统性 RNAi

植物韧皮部是植物运输光合产物、防御成分和细胞信号传导的输导组织,植物长距离转运的系统性 RNAi 也是经韧皮部转运的。植物长距离转运 RNAi 现象首次发现于烟草嫁接试验。转基因沉默砧木的沉默信号能够传递给非沉默的接穗,还能够通过嫁接的野生型烟草茎秆传递给嫁接于茎秆之上的非沉默的接穗^[5]。随后,通过嫁接试验在黄瓜^[7]、向日葵^[8]、番茄^[6]和拟南芥^[20]中也发现相同的沉默转运现象。在韧皮部长距离转运过程中,发生沉默的植物韧皮部中有 siRNA 的合成,并作为信号分子从起始部位进行传播^[7],这些 siRNA 信号分子大于 21 nt,为 24~26 nt^[16]。另外,某些 miRNA (mi-

croRNA)及其运输蛋白可能也参与其中^[7,21]。

4 植物环境 RNAi

在秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)和其他一些动物中,通过饲喂 dsRNA 制剂或饲喂表达 dsRNA 的细菌细胞诱发 RNAi,称为环境 RNAi,其在动物功能基因组研究和害虫防治方面得到了广泛应用^[22]。在植物中也存在环境 RNAi。Tenllado 等^[23]利用合成的含有烟草花叶病毒、马铃薯 Y 病毒或苜蓿花叶病毒基因部分序列的 dsRNA,采用摩擦接种的方法与病毒粒子一起接种对这些病毒敏感的烟草,能够有效干扰病毒的侵染。接种病毒的正义单链 RNA(ssRNA)、反义 ssRNA 或非同源序列的 dsRNA,均不能有效防治病毒侵染。而后, Tenllado 等^[24]直接喷施表达病毒基因部分序列的 dsRNA 的大肠杆菌细胞裂解液,同样能够起到防治病毒侵染的作用。应用细菌表达生产 dsRNA,成本低且便于放大,适合大批量生产。此后相继出现多篇关于喷施表达病毒基因部分序列 dsRNA 的大肠杆菌裂解液防治植物病毒报道,防治的植物病毒包括黄瓜花叶病毒^[25]、黄瓜绿斑驳花叶病毒^[26]、甘蔗花叶病毒^[27]、烟草花叶病毒和马铃薯 Y 病毒^[28-29]。笔者采用根施细菌合成的特异性 dsRNA 干扰烟草烟碱合成关键酶也取得了良好效果(数据尚未发表)。另外,外施特异性 dsRNA 还能够防治叶绿体复制类病毒和核复制类病毒^[30]。在此,首次提出植物环境 RNAi 的概念,即植物也可以从环境中吸收 dsRNA 而诱发 RNAi。

然而,外施 dsRNA 防治植物病毒的缺点是不能治愈已感染病毒的植物,而且与转基因抗病毒的植物相比,其抗病毒作用无持久性,喷施 1 次抗病毒作用仅能持续 5 d^[23,27]。由于有多少外施的 dsRNA 能够进入植物细胞难以定量,因此,无法确定诱发 RNAi 所需 dsRNA 的适宜用量。试验发现,采用 RNAi 防治辣椒轻斑驳病毒,外施 dsRNA 的量高于病毒 RNA 量 500 倍是干扰病毒复制的最低阈值^[31];而诱发秀丽隐杆线虫发生 RNAi 只需要饲喂很少量的 dsRNA^[32]。其原因可能是在线虫中有 RNA 的扩增,有新的 dsRNA 的合成和剪切后生成的次级 siRNA;而在植物中,外施的 dsRNA 没能触发新 dsRNA 的合成。

目前,关于植物环境 RNAi 发生机制的研究几乎还是空白,而动物环境 RNAi 发生机制的研究已取得很大进展。秀丽隐杆线虫环境 RNAi 发生的第一步是肠道细胞从肠内腔吸收 dsRNA,第二步是肠

道细胞输出 dsRNA 或源自 dsRNA 的沉默信号,第三步是沉默信号输入其他组织(如肌肉、表皮和生殖细胞),第四步通过细胞自主 RNAi 机制诱发目标基因沉默。已发现多种跨膜蛋白和转运蛋白基因参与线虫环境 RNAi,如一种多跨膜蛋白(相当于 dsRNA 通道)基因 *sid-1* 和另一种单跨膜蛋白(相当于 dsRNA 受体)基因 *sid-2* 参与了第一步过程^[22]。饲喂诱发的环境 RNAi 和注射诱发的环境 RNAi 在机制上有所不同,许多基因参与饲喂诱发的环境 RNAi,但并不参与注射诱发的环境 RNAi^[22]。

5 展望

应用转基因植物包括 RNAi 转基因植物进行功能基因组研究和育种研究(包括病虫害抗性育种),存在操作繁琐、周期长、转化率低等问题,其安全性尚存在较大争议,而应用植物非细胞自主性 RNAi,尤其是环境 RNAi,利用人工合成或细菌合成的 dsRNA 对植物进行外施,实现功能基因组研究、沉默不良基因或防治病虫害,可能是一条安全、高效且成本低廉的途径。尽管非细胞自主性 RNAi 现象在植物中的发现早于动物,但在实际应用和机制研究方面却远远落后于动物。由于机制研究的滞后,影响了植物环境 RNAi 的应用,比如外施 dsRNA 还是外施 siRNA 的效果更好,哪种施用途径更有效,哪些基因参与了 dsRNA 及其他沉默信号的吸收、转运,如何实现外施 dsRNA 在植物体内扩增及持久诱发 RNAi,等等。随着植物环境 RNAi 机制研究的不断深入,在可预见的将来,植物环境 RNAi 将会在农业生产中得到广泛应用。

参考文献:

- [1] Uddin M N, Kim J Y. Non-cell-autonomous RNA silencing spread in plants[J]. Botanical Studies, 2011, 52:129-136.
- [2] 王秀红,关超,孙景桐,等. RNAi 的发现及其在动植物上的应用前景[J]. 山西农业科学, 2005, 33(1):12-14.
- [3] 景天忠,董瀛谦,张海侠,等. RNAi 技术防治害虫的研究进展[J]. 中国森林病虫, 2012, 31(2):19-22.
- [4] Voinnet O, Baulcombe D C. Systemic signalling in gene silencing[J]. Nature, 1997, 389:553.
- [5] Palauqui J C, Elmayan T, Pollien J M, et al. Systemic acquired silencing: Transgene specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions[J]. EMBO J, 1997, 16: 4738-4745.

- [6] Shahrudin N A, Han Y, Li H, *et al.* The mechanism of graft transmission of sense and antisense gene silencing in tomato plants[J]. FEBS Letters, 2006, 580: 6579-6586.
- [7] Yoo B C, Kragler F, Varkonyi-Gasic E, *et al.* A systemic small RNA signaling system in plants[J]. Plant Cell, 2004, 16: 1979-2000.
- [8] Hewezi T, Alibert G, Kallerhoff J. Local infiltration of high- and low-molecular-weight RNA from silenced sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants triggers posttranscriptional gene silencing in non-silenced plants[J]. Plant Biotechnol J, 2005, 3: 81-89.
- [9] Kalantidis K, Schumacher H T, Alexiadis T, *et al.* RNA silencing movement in plants[J]. Biol Cell, 2008, 100: 13-26.
- [10] Klahre U, Crete P, Leuenberger S A, *et al.* High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants[J]. PNAS, 2002, 99: 11981-11986.
- [11] Dunoyer P, Scott G, Himber C D, *et al.* Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells[J]. Science, 2010, 328: 912-916.
- [12] Lucas W J, Lee J Y. Plasmodesmata as a supracellular control network in plants[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004, 5: 712-726.
- [13] Oparka K J. Getting the message across: How do plant cells exchange macromolecular complexes[J]. Trends Plant Sci, 2004, 9: 33-41.
- [14] Kim I, Zambryski P C. Cell-to-cell communication via plasmodesmata during *Arabidopsis* embryogenesis[J]. Curr Opin Plant Biol, 2005, 8: 593-599.
- [15] Maule A J. Plasmodesmata: Structure, function and biogenesis[J]. Curr Opin Plant Biol, 2008, 11: 680-686.
- [16] Himber C, Dunoyer P, Moissiard G, *et al.* Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing[J]. EMBO J, 2003, 22: 4523-4533.
- [17] Parizotto E A, Dunoyer P, Rahm N, *et al.* In vivo investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA[J]. Genes Dev, 2004, 18: 2237-2242.
- [18] Kalantidis K, Schumacher H T, Alexiadis T, *et al.* RNA silencing movement in plants[J]. Biol Cell, 2008, 100: 13-26.
- [19] Dunoyer P, Himber C, Ruiz-Ferrer V, *et al.* Intra- and intercellular RNA interference in *Arabidopsis thaliana* requires components of the microRNA and heterochromatic silencing pathways[J]. Nat Genet, 2007, 39: 848-856.
- [20] Brosnan C A, Mitter N, Christie M, *et al.* Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in *Arabidopsis*[J]. PNAS, 2007, 104: 14741-14746.
- [21] Lin S I, Chiang S F, Lin W Y, *et al.* Regulatory network of microRNA399 and *PHO2* by systemic signaling[J]. Plant Physiol, 2008, 147: 732-746.
- [22] Whangbo J S, Hunter C P. Environmental RNA interference[J]. Trends Genet, 2008, 24: 297-305.
- [23] Tenllado F, Díaz-Ruiz J R. Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection[J]. J Virol, 2001, 75: 12288-12297.
- [24] Tenllado F, Martínez-García B, Vargas M, *et al.* Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections[J]. BMC Biotechnol, 2003, 3: 1-12.
- [25] 张德咏, 朱春晖, 成飞雪, 等. 表达 dsRNA 的细菌提取液可抑制黄瓜花叶病毒对烟草的侵染[J]. 植物病理学报, 2008, 38(3): 304-311.
- [26] 郑海刚, 陈启建. 诱导提取的 dsRNA 粗提液对黄瓜绿斑驳花叶病毒的抑制作用[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2011, 40(4): 346-351.
- [27] Gan D, Zhang J, Jiang H, *et al.* Bacterially expressed dsRNA protects maize against SCMV infection[J]. Plant Cell Rep, 2010, 29: 1261-1268.
- [28] Yin G, Sun Z, Liu N, *et al.* Production of double stranded RNA for interference with TMV infection utilizing a bacterial prokaryotic expression system[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 84: 323-333.
- [29] Yin G H, Sun Z N, Song Y Z, *et al.* Bacterially expressed double-stranded RNAs against hot-spot sequences of tobacco mosaic virus or potato virus Y genome have different ability to protect tobacco from viral infection[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2010, 162: 1901-1914.
- [30] Carbonell A, de Alba A E M, Flores R, *et al.* Double-stranded RNA interferes in a sequence-specific manner with the infection of representative members of the two viroid families[J]. Virology, 2008, 371: 44-53.
- [31] Tenllado F, Llave C. RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants[J]. Virus Research, 2004, 102: 85-96.
- [32] Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 1998, 391: 806-811.