

## RNAi 技术在抗大豆胞囊线虫基因工程研究中的应用

杨 巧, 刘 倩, 简 恒

(中国农业大学 植物病理系, 北京 100193)

**摘 要:**大豆胞囊线虫对大豆生产的危害连年加重,以轮作等农业措施和化学农药为主的传统防治难以满足现代农业生产的需要,常规的抗性育种和转基因育种又有一定的局限性。近年来 RNAi 技术的应用为大豆胞囊线虫功能基因组研究及抗线基因工程带来新的突破。通过生物信息学技术筛选潜在的候选靶标基因,合成 dsRNA 或构建 RNA 干扰载体,靶基因的 dsRNA 或 siRNA 经线虫口针取食被导入体内,进而引发线虫的系统性 RNA 干扰反应,导致其出现寄生、发育、代谢、运动、繁殖等障碍甚至致死,从而实现对大豆胞囊线虫的抗性。尽管影响 RNAi 表型变化的因素众多(如 dsRNA 的剂量、序列长度及结构差异等),但对其关键问题进行分析 and 修正,做好生态风险评估, RNAi 仍是当前线虫基因功能分析和植物抗线虫基因工程方面的重要手段。小 RNA 测序、amiRNAi 技术等都将加快 RNAi 技术的发展。本文介绍了 RNAi 在植物寄生线虫中的作用机制及其在抗大豆胞囊线虫植物基因工程中的应用,并对其应用研究中的关键问题和前景进行了讨论。

**关键词:** RNAi; 抗大豆胞囊线虫; 基因工程

**中图分类号:** S565.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-9841(2013)04-0548-07

## Technology of RNAi and Its Application in Genetic Engineering against Soybean Cyst Nematode of Soybean

YANG Qiao, LIU Qian, JIAN Heng

(Department of Plant Pathology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract:** Soybean production losses caused by soybean cyst nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe) are increasing continually. Traditional control strategies such as rotation system and nematicides can't meet the needs of modern agriculture development. Resistance breeding and transgenic breeding also have serious limitations. Recently RNA interference technology represents an emerging breakthrough in the application of functional genomics for genetic engineering against soybean cyst nematode. Screen for potential target genes by the application of bioinformatics, and then synthesize dsRNAs or construct the RNAi vector carrying the desired gene sequences. dsRNA or siRNAs of essential genes was oral uptaken by established plant parasitic nematodes through the feeding tube, which elicit a systemic RNAi response and then induce a highly detrimental (suppressing nematode parasitism, development, metabolism, motion, and reproduction) or even lethal RNAi phenotype in nematodes. Although there is still poor understanding of the range of factors (dsRNA concentrations, construct size, *et al*) that influence RNAi phenotype, modifying current RNAi strategies and performing proper ecological risk assessment can also highlight the novel strategies available for revealing gene function of nematodes and improving host derived RNAi resistance. In the near future, small RNA sequencing techniques and amiRNAi can promote the development of RNAi technologies. This paper reviews the mechanism of RNAi against plant parasitic nematodes, the progress of RNAi-mediated defense against soybean cyst nematodes, the characteristics and some key points of this strategy, and also prospect of its application.

**Key words:** RNA interference; Resistance to soybean cyst nematode; Genetic engineering

大豆胞囊线虫 (*Heterodera glycines* Ichinohe) 隶属于线虫门 (Nematoda)、色矛纲 (Chromadorea)、小杆目 (Rhabditida)、垫刃总科 (Tylenchoidae)、胞囊线虫属 (*Heterodera*)<sup>[1]</sup>。大豆胞囊线虫主要为害以大豆为主的豆科植物,一般可使大豆减产10%~20%,严重的可达30%~50%,甚至绝产<sup>[2]</sup>。由大豆胞囊线虫侵染引起的大豆胞囊线虫病,是世界大豆生产上公认的毁灭性土传病害。其特点是分布广、危害重、难防治,传播途径多且休眠体(胞囊)存活时间

长,已成为限制大豆产量和品质提高的重要因素之一。

### 1 大豆胞囊线虫病的危害及传统防治策略

大豆胞囊线虫主要危害寄主根部。大豆胞囊线虫的二龄幼虫先用口针反复穿刺根的表皮细胞,然后整个虫体经皮层进入中柱,之后不断向寄主细胞分泌物质,将取食位点处的细胞壁降解,从而促

收稿日期:2013-03-07

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(200903040)。

第一作者简介:杨巧(1989-),女,在读硕士,主要从事分子线虫学研究。E-mail: yangqiaomei@163.com。

通讯作者:简恒(1961-),男,教授,博士生导师,主要从事植物病原线虫学研究。E-mail: hengjian@cau.edu.cn。

使相邻细胞相互融合形成合胞体。线虫在根内定殖后,根系发育变弱,根瘤显著减少,但须根增多。成株期寄主受害后,在发病初期或发病轻时,表现为叶片褪色缺绿,逐渐黄化,可在田间出现成片叶片发黄、矮化的植株。严重者生长瘦弱,不结实或结实稀少,逐渐干枯而死<sup>[2]</sup>。被害根部表皮龟裂,极易受其他真菌或细菌侵害引起腐烂,使病株提前枯死。检查根系时,在根上可发现白色或淡黄色的肉质小颗粒,即线虫的成熟雌虫。

目前防治胞囊线虫主要采用 3 种策略:一是以轮作为主的栽培措施,如大豆与非寄主作物轮作,有条件的地区实行水旱轮作,可以一定程度降低虫口密度。在胞囊密度大的地块,种植非寄主植物 8 年后再种大豆,仍可造成严重减产。因此重病区不能单纯依靠轮作<sup>[2]</sup>。轮作制中加入一季大豆的抗病品种或诱捕作物(如绿肥作物等),也可减少轮作年限提高防病效果。但在可耕地锐减及经济利益的驱动下,这类措施给农业生产安排带来很多不便,使生产者的收益受损。二是使用化学杀线剂,目前市场上有一些高效的化学农药,如熏蒸剂、种衣剂等,可以降低胞囊线虫对作物的危害,但普遍成本较高且不少为高毒农药,严重污染环境,还容易引发人畜中毒事件。三是选育抗线虫品种,种植抗线品种是防治大豆胞囊线虫病的理想选择。传统的抗病育种存在育种周期长、工作量大、抗源较单一的问题。线虫种群表现出的高水平遗传多样性限制了现有抗病品种的有效使用,且在选择压力下,线虫的生理小种易发生变化<sup>[3]</sup>。在生产上,抗病性与丰产性不易兼得,还需面临抗病品种合理布局的考验,以防抗病性丧失等问题。

由此可以看出,传统的大豆胞囊线虫病防治策略已难以满足现代农业生产的需要。RNAi 现象被发现和阐释后,随着分子生物学、植物基因工程和生物信息学的发展,RNAi 已成为一种应用于植物病原线虫基因功能研究的工具,并作为一种手段,应用于基因工程改良植物中。

## 2 外源性 RNAi 的机制

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是由双链 RNA(double-strand RNA, dsRNA)在细胞内特异性地诱导与之同源互补的 mRNA 降解,使相应基因的表达关闭,从而引发转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS),能诱使细胞表现出特定基因缺失的表型<sup>[4]</sup>。其基本原理是<sup>[5]</sup>:在 RNAi 的起始阶段,外源性 dsRNA 进入宿主细胞后,与具有 RNase III 活性的核酸内切酶 Dicer 结合,随后被 Dicer 切割为

21~23 nt 的小干扰 RNA 片段(small interference RNA, siRNA)。在 RNAi 的效应阶段,siRNA 与一些蛋白质结合形成 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)。siRNA 能指导 RISC 寻找细胞中同源 mRNA 并与其特异性结合,之后通过依赖于 ATP 的酶解开 siRNA 的双链并将其正义链与靶标单链 mRNA 置换,即 mRNA 取代 siRNA 的正义链,与其反义链互补,继而核酸酶将 mRNA 切割成 21~23 nt 的小片段,切割部位大约在与 siRNA 反义链配对序列的中部,而后 mRNA 进一步降解。

在防治植物寄生线虫的 RNAi 策略中, RNAi 系统流程一部分在植物体内完成,一部分在线虫体内完成。转基因植株在体内表达寄生线虫特异靶基因的 dsRNA,植物体内 Dicer 酶加工 dsRNA 形成 siRNAs。当线虫取食植物根部时,通过口针将植物介导的 siRNA 或 dsRNA 摄取入体内。如果线虫摄取了长的 dsRNA,线虫体内的 Dicer 酶会把 dsRNA 加工成 siRNAs。随即 RISC 参与靶标 mRNA 的降解。在线虫中, RISC 还有 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRP)功能。它以 siRNA 反义链为引物,以靶基因 mRNA 为模板,合成大量新的 dsRNA,再由 Dicer 特异性识别,切割生成新的 siRNA,介导新一轮同源 mRNA 的降解,沉默信号不断放大<sup>[6-8]</sup>。研究证实 RNAi 效应不仅能在细胞与细胞之间传递<sup>[9-10]</sup>,还能遍及整株植物<sup>[11]</sup>。

## 3 大豆胞囊线虫的体外 RNAi (in vitro RNAi)

在自由生活的秀丽小杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的 RNAi 研究中,将线虫浸泡于含 dsRNA 的溶液<sup>[12]</sup>,喂食表达 dsRNA 的转基因细菌<sup>[13-14]</sup>以及显微注射法<sup>[4,15]</sup>等均可实现 dsRNA 向线虫体内的导入;而在植物体外的大豆胞囊线虫二龄幼虫个体小、角质层厚,在寄生前不取食,没有成熟的转基因体系,显微注射 dsRNA 难度较大,使得同样的方法难以借鉴。

2002 年,英国科学家 Urwin 等发现使用神经刺激剂章鱼胺(octopamine)可诱导大豆胞囊线虫寄生前二龄幼虫取食,喂食半胱氨酸蛋白酶 dsRNA 后,产生了特异性的 RNA 干扰,线虫体内该基因的 mRNA 水平降低,处理后的线虫与对照相比,雌雄虫比例发生了明显改变<sup>[16]</sup>。该实验证实外源 dsRNA 经大豆胞囊线虫取食进入体内后,可以导致同源基因发生转录后基因沉默。近几年,大豆胞囊线虫体外 RNAi 的研究成为一个热点(表 1)。

表 1 RNAi 靶定的大豆胞囊线虫基因及表型

Table 1 *Heterodera glycines* genes targeted by RNAi and the resulting phenotype

基因名称/GenBank 序号 Gene name/GenBank accession No.	目标基因的指定功能 Putative functions of target genes	试验方法 Method delivery	表型及降低率 Phenotype and reduction percentage/%	文献 References
<i>hgctl</i> , AF498244	C-type lectin	Soaking J2	41% decrease in number of established nematodes	Urwin <i>et al.</i> (2002) <sup>[16]</sup>
<i>hgcp-I</i>	Cysteine proteinase	Soaking J2	Increased male;female ratio	Urwin <i>et al.</i> (2002) <sup>[16]</sup>
<i>MSP</i>	Major sperm protein	Soaking J2	Reduction in mRNA-no phenotypic effect at 14dpi	Urwin <i>et al.</i> (2002) <sup>[16]</sup>
<i>Hg-amp-1</i> , AY883023	Aminopeptidase	Soaking J2	61% decrease in number of female reproductive	Lilley <i>et al.</i> (2005) <sup>[42]</sup>
<i>Hg-rps-23</i> , BF014259	Ribosomal protein	Soaking J2	Decrease in J2 viability	Alkharouf <i>et al.</i> (2007) <sup>[34]</sup>
<i>hg-eng-1</i> , AF006052	$\beta$ -1,4-endoglucanase	Soaking J2	Decrease in number of established nematodes	Bakhetia <i>et al.</i> (2007) <sup>[38]</sup>
<i>hg-pel</i> , AF520566	Pectate lyase	Soaking J2	Increased male;female ratio	Bakhetia <i>et al.</i> (2007) <sup>[38]</sup>
<i>hg-cm</i> , AF520565	Chorismate mutase	Soaking J2	Increased male;female ratio	Bakhetia <i>et al.</i> (2007) <sup>[38]</sup>
<i>hg-syv46</i> , AF273728	Secreted peptide SYV46	Soaking J2	Decrease in number of established nematodes	Bakhetia <i>et al.</i> (2007) <sup>[38]</sup>
<i>hg-gp</i> , AF502392	Unknown gland protein	Soaking J2	Increased male;female ratio	Bakhetia <i>et al.</i> (2007) <sup>[38]</sup>
<i>MSP</i>	Major sperm protein	<i>In planta</i>	Up to 68% reduction in nematode eggs	Steeves <i>et al.</i> (2006) <sup>[27]</sup>
<i>Hg-rps-3a</i> , CB379877	Ribosomal protein3a	<i>In planta</i>	87% reduction in female cysts	Klink <i>et al.</i> (2009) <sup>[19]</sup>
<i>Hg-rps-4</i> , CB278739	Ribosomal protein 4	<i>In planta</i>	81% reduction in female cysts	Klink <i>et al.</i> (2009) <sup>[19]</sup>
<i>Hg-spk-1</i> , BI451523.1	Spliceosomal SR protein	<i>In planta</i>	88% reduction in female cysts	Klink <i>et al.</i> (2009) <sup>[19]</sup>
<i>Hg-snb-1</i> , BF014436	Synaptobrevin	<i>In planta</i>	93% reduction in female cysts	Klink <i>et al.</i> (2009) <sup>[19]</sup>
Y25, CB824330	Beta subunit of the COPI complex	<i>In planta</i>	81% reduction in nematode eggs	Li <i>et al.</i> (2010) <sup>[23,29]</sup>
<i>Prp-17</i> , AF113915	Pre-mRNA splicing factor	<i>In planta</i>	79% reduction in nematode eggs	Li <i>et al.</i> (2010) <sup>[29]</sup>
<i>Cpn-1</i> , GU074018	Unknown protein	<i>In planta</i>	95% reduction in nematode eggs	Li <i>et al.</i> (2010) <sup>[29]</sup>

表中数据源自参考文献[3]和[41]

The data in the table are from references[3] and[41].

#### 4 植物介导的抗大豆胞囊线虫的 RNAi 策略 (plant-mediated RNAi)

通过浸泡等方式诱导线虫基因沉默(体外 RNAi)持续的时间较短,解决这一问题的策略是由寄主向寄生阶段线虫提供 dsRNA。大豆胞囊线虫不能像根结线虫、甜菜胞囊线虫那样,在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)上寄生并完成生活史。大豆胞囊线虫中植物介导的 RNAi 策略大多采用寄主植物大豆进行抗线虫实验,但也有特例。Hamamouch 等<sup>[17]</sup>利用在大豆胞囊线虫及甜菜胞囊线虫寄生期表达的 *30C02* 基因具有的高度同源性,在甜菜胞囊线虫与拟南芥形成的植物病害体系(pathosystem)中,证实了胞囊线虫 30C02 效应因子蛋白与拟南芥  $\beta$ -1,3 内切葡聚糖酶存在互作,并且证实表达 *30C02* 基因 dsRNA 的拟南芥植株能够显著抵抗甜菜胞囊线虫的侵染。

植物介导的 RNAi (plant-mediated RNAi) 主要有 3 种途径。一是由转基因植株介导,目前采用的基因枪法、根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导法、花粉管通道法等产生转基因大豆植株的转化方法,仍然不能克服大豆转化效率低的障碍。第二种途径以 Kereszt 等<sup>[18]</sup>建立的基于发根土壤杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 介导的大豆转化体系为代表。该体系形成地下部分为转基因发根,地上部分为非转基因茎叶系统的大豆植株<sup>[18-23]</sup>。将带有靶基因发夹结构的载体转化发根土壤杆菌,侵染大豆近子叶节的下胚轴伤口,产生大量的转基因毛状根。当大豆胞囊线虫二龄幼虫取食大豆根部时,植物根部产生的 dsRNA 被摄取,通过观察线虫受干扰后的表型来筛选干扰效果明显的基因。这套体系比常规大豆遗传转化的操作更易、耗时更短。利用其来验证生物信息学技术筛得的潜在靶标基因的干扰效果,最终获得 RNAi 表型明显的致死或不育基因,为培育抗大豆胞囊线虫的新大豆栽

培品种奠定基础。第三种是以 TRV 介导为主的通过病毒侵染的 RNAi 方式。RNA 病毒在植物中系统性传播,它们复制时会介导 dsRNA 分子的合成。将线虫特异性序列导入病毒载体可以使植物细胞产生靶 dsRNA。一般选择烟草脆裂病毒(*Tobacco rattle virus*, TRV)作载体,因为它向根部移动,并且在根内复制,而且不会对受侵染的组织造成伤害。TRV 已被证实能在甜菜胞囊线虫诱导的合胞体中有效增殖,产生 RNA 干扰效应<sup>[24]</sup>。

植物介导的 RNAi 技术在抗大豆胞囊线虫方面已有较多的研究报道(表 1)。在植物中转入含线虫基因的 RNA 干扰载体,能够表达线虫目标基因的 dsRNA 或 siRNA,经线虫口针取食传送到体内,引发线虫系统性的 RNAi 反应,当靶基因为重要基因时,会导致其出现寄生、发育、代谢、运动等障碍甚至致死,从而实现转基因植物对寄生线虫的抗性<sup>[25-26]</sup>。Steeves 等<sup>[27]</sup>通过寄主大豆诱导的线虫 RNA 干扰来减少发育中大豆胞囊线虫雌虫的数目。通过寄主诱导线虫特异的精子蛋白基因(*MSP*)的沉默,导致转基因植株每克根形成的卵粒数减少 68%。Klink 等<sup>[28]</sup>利用大豆胞囊线虫多个基因的反向重复序列有效地抑制了胞囊形成。Li 等<sup>[23,29]</sup>对大豆胞囊线虫 3 个不同基因进行 RNA 干扰,显著地降低了胞囊线虫的繁殖量,并通过实时荧光定量 PCR 的验证,为线虫取食转基因根后,寄主介导的线虫靶基因下调提供直接的分子证据。

## 5 RNAi 在大豆胞囊线虫基因功能研究中的应用

理论上,任何导致线虫出现寄生、发育、代谢、运动等障碍甚至致死表型的基因都可作为潜在的抗线虫靶标。如对模式线虫 *Caenorhabditis elegans* 进行高通量 RNAi 分析,鉴定出约 1 750 个经敲除后能够产生致死或不育表型的基因<sup>[30-33]</sup>。因此,在线虫基因组或 EST 库信息较完备的情况下,可用于抗线虫的靶标基因选择余地较大。同时,通过比较基因组学的方法,参考 *C. elegans* 功能基因组学的研究结果,可以方便地筛选出植物寄生线虫的目标基因<sup>[34]</sup>。

目前,大豆胞囊线虫 92.5 Mb 大小<sup>[35]</sup>的全基因组测序已经完成,正在进行拼接工作。利用生物信息学筛选手段,将大豆胞囊线虫的 EST 序列与 *C. elegans* 具有 RNAi 表型的序列相比对,从中筛选出大豆胞囊线虫潜在且特异的具有致死或不育表型的基因序列。利用这种方法,已从大豆胞囊线虫 EST 数据库中鉴定出 1 508 个候选靶基因<sup>[34]</sup>。即便如此,该方法仍存在一定的风险,同一功能的基因,在 RNAi 实验中,或许对 *C. elegans* 的生长发育存在明显的抑制作用,但对于大豆胞囊线虫的作用尚需进一步研究;反

之亦然。因此,需要对生物信息学技术筛选出的靶标基因做更为详细的 RNAi 验证实验。

线虫 RNAi 的靶标基因大致可分为 3 种类型:寄生基因、生长发育基因和 mRNA 新陈代谢相关基因<sup>[3,36]</sup>。编码分泌性蛋白的寄生基因是目前分子线虫学的研究热点,对这类效应基因作用机理的研究,有助于逐步解析线虫与植物协同作用的分子机制,对于鉴定防治线虫的靶标基因,开展以 RNAi 为主的基因调控抗线虫研究有重要意义<sup>[37]</sup>。大豆胞囊线虫 *Hg-syr46* 基因编码的蛋白产物与拟南芥的 CLE 家族相似,涉及植物分生组织细胞增殖与分化的调控,因此,它可能在线虫取食部位紊乱正常模式的植物细胞分化<sup>[38]</sup>。大豆胞囊线虫和马铃薯胞囊线虫的  $\beta$ -1,4-内切葡聚糖酶能降解植物组织,便于线虫侵入及迁移<sup>[38-39]</sup>。南方根结线虫和大豆胞囊线虫的半胱氨酸蛋白酶基因在线虫侵入植物中起重要作用,干扰该基因能显著降低线虫的侵染量<sup>[16,40]</sup>。另外,干扰线虫胚胎形成、幼虫生长发育及繁殖的相关基因,可能对寄生线虫的生活史产生影响。Alkharouf 等<sup>[34]</sup>通过生物信息学技术,筛选出 1 508 个与 *C. elegans* 具有致死或不育表型(或拟表型)基因同源性较高的大豆胞囊线虫候选基因,通过体外 RNAi 实验,发现编码核糖体蛋白 rps-23 的基因在大豆胞囊线虫的生长发育中具有重要作用。Klink 等<sup>[28]</sup>证实了大豆胞囊线虫中因建立取食位点而诱导表达的 32 个基因,随后串联 4 个基因(分别编码小核糖体蛋白 3a、4,剪接体 SR 蛋白以及小突触泡蛋白)的反向重复序列,通过基因工程转化大豆后,抑制了雌虫的形成。另一方面,干扰 mRNA 新陈代谢相关基因同样能有效抑制线虫的生长发育或繁殖。大豆胞囊线虫 *Prp-17* 基因能编码一种 mRNA 剪接因子,通过转基因大豆植株介导该基因的 RNAi,每克根上的胞囊数减少 53%,每克根上的卵粒数减少 79%,*Prp-17* 基因在 *C. elegans* 中同样扮演重要角色<sup>[29]</sup>。

## 6 应用 RNAi 技术的关键问题

从宏观方面考虑,应用 RNAi 技术的关键问题在于是否可以通过生物信息学技术或进一步高通量筛选方案<sup>[43]</sup>找到潜在的 RNAi 关键靶标基因,以怎样有效的方式将靶标基因的 dsRNA 输送至线虫体内。这其间涉及线虫种属、龄期对 RNAi 干扰的敏感性,RNAi 干扰是否遗传以及对非靶标影响的评估等问题。例如,筛选线虫 RNAi 靶标基因时,考虑到生物安全性,还需要在核苷酸或蛋白质序列比对过程中调整 E-value 的大小,剔除与寄主植物、模式植物拟南芥以及人类同源性较高的序列。目前有观点认为还需将模式生物果蝇或一些传粉有益昆

虫的生物安全纳入考虑范围,并进行生态风险评估(ecological risk assessments, ERAs),谨防产生负面的非靶效应(non-target effects);同时,对于转基因植物的鉴定、环境中 RNA 的持久性评估也将予以重视<sup>[44]</sup>。

从具体问题来说,一个关键的因素在于线虫是否能够摄取体外 RNAi 实验中或者植物细胞内表达的 dsRNA 或 siRNA 分子。根结线虫和胞囊线虫在植物细胞内通过一种叫吸食管的特殊结构来摄取食物,这个吸食管具有分子筛作用,用来帮助阻止线虫从植物中摄取大分子物质<sup>[45]</sup>。分子筛是从植物到线虫传递杀线虫 dsRNA 及蛋白质的关键。研究表明,根结线虫和胞囊线虫的口针允许最大约 20 ~ 40 kDa 的分子通过<sup>[46-47]</sup>, 42 ~ 1 300 bp 的 dsRNA 分子均被证明能有效地在根结线虫和胞囊线虫中引发 RNAi 效应<sup>[39,48-49]</sup>。并且胞囊线虫能摄取小于 28 kDa 的食物,根结线虫相比胞囊线虫能够摄取更大的分子<sup>[41,46-47]</sup>。南方根结线虫摄取荧光蛋白(GFP, 28 kDa)的效率比马铃薯金线虫更高,该现象也印证了吸食管具有分子筛作用<sup>[46,50]</sup>。这可能是目前胞囊线虫 RNAi 的要低于根结线虫的重要原因。在植物介导的传统 RNAi 中,选择用于干扰根结线虫或胞囊线虫的靶基因序列长度一般为 200 ~ 500 bp。

对于不同的基因, RNA 干扰的策略和方法不同。在线虫中,有些基因很容易受到 RNA 干扰。而还有许多基因属于多拷贝基因家族,这样的基因家族可能会因为其各级冗余功能的存在而影响 RNAi 干扰效果。对于其他一些在特定条件下才表达的基因或者无明显表型的基因, RNAi 也无法检测其功能而导致假阴性的产生。值得一提的是,由 siRNA 介导产生的基因沉默具有较高的序列特异性,但是也能由一段序列<sup>[51]</sup>或发夹结构<sup>[52]</sup>引起家族基因非特异性的沉默,产生脱靶效应(off-target effects)。这种多效性作用还可能发生在因序列同源性引发的寄主植物或环境中其他生物的基因沉默。目前一些研究将非线虫的 dsRNA 作为阴性对照,如绿色荧光蛋白基因(*gfp*)、大豆 RuBP 羧化酶亚基<sup>[34]</sup>等,以此评价特异靶标基因沉默效应的可信度。

就 RNAi 实现途径而言,体外 RNAi 用时短、操作简便,但存在一些问题。首先,所用线虫材料应是新孵化的、活性较好的寄生前二龄幼虫,需要人为加入章鱼胺或间苯二酚等刺激剂诱导其摄取 dsRNA。间苯二酚在高浓度下会导致线虫活力下降,低浓度又难以达到高剂量吞食;章鱼胺诱导进食效果稍弱,需要延长 dsRNA 处理时间,增加了降解的机率<sup>[37]</sup>。同时,实验处理中所用的 dsRNA 或 siRNA 浓度(剂量)、长度及序列结构差异、浸泡时间、线虫活力的影响等都可能对实验结果产生偏差。植物寄生线虫进行体外 RNAi 实验所使用的

dsRNA 剂量一般为 1 ~ 5 mg · mL<sup>-1</sup><sup>[53]</sup>,进而可以建立抑制现象与浓度的依赖性模型<sup>[49,54]</sup>。再次,体外 RNAi 的干扰作用在线虫取食后一段时间便会自动恢复,不同种类线虫干扰持续的时间从几天到十几天不等。RNAi 的持久性取决于靶基因的表达模式、初始水平及内源转录物的转换率。这样难以在一个时间点准确检测靶基因的变化水平。在大豆胞囊线虫中,亚腹食道腺的纤维素酶转录物在浸泡后 6 ~ 10 d 开始恢复<sup>[38]</sup>。

相对于体外 RNAi,植物介导的 RNAi 是在线虫侵入寄主后在转基因寄主组织中主动取食 dsRNA 或 siRNA,不需人为加入刺激剂。而且,其 RNA 干扰效果持续在线虫的整个寄生阶段。需要注意的是, RNAi 的有效性依赖于许多因素,如靶基因的表达方式和表达水平、dsRNA 片段的大小和序列组成及其在靶基因中的位置、siRNA 分子的可用性等<sup>[53,55]</sup>。植物中不存在线虫的靶基因,因此线虫 siRNA 的数量不会呈现指数增长<sup>[56]</sup>。用两种不同的启动子构建载体转化植物,比较它们引起基因沉默的效果,发现要触发线虫的基因沉默,取食位点细胞产生的发夹 RNA 要达到一定的阈值水平<sup>[57]</sup>。目前成功的 RNAi 使用的都是强启动子,如花椰菜花叶病毒 CAMV 的 35S 启动子。植物介导的 RNAi 需要强启动子控制发夹 RNA 的合成与许多浸泡程序中较高浓度的 dsRNA 是一致的<sup>[58]</sup>。

## 7 展 望

相比传统 RNAi 容易引发脱靶效应的事实,目前 amiRNAi(artificial microRNA interference)技术的应用能够介导特异性更强的基因沉默。amiRNAs 是一类由内源 miRNA 前体生成的长 21 个核苷酸的人工小 RNA 分子,它能在不影响其他基因表达的情况下特异地介导单个或多个靶基因高效稳定沉默。传统 RNAi 载体包含靶标基因的反向重复序列,可被切割为不同种类的 siRNAs,可能作用于多个目标序列,引发脱靶效应。amiRNA 表达载体则包含与靶 mRNA 互补的长 21 nt 的序列,在更大程度上规避了对相似序列的非靶标基因影响,具有特异性高、稳定性强和沉默效应可预见等优点。Melito 等<sup>[59]</sup>利用 amiRNA 技术研究了大豆 *Rhg1* 位点上一个编码富含亮氨酸重复序列的跨膜受体激酶(LRR-kinase)的基因,证实其对大豆胞囊线虫抗性没有显著影响。

基于新一代测序技术的小分子 RNA 测序(small RNA sequencing),通过分离特定大小的 RNA 分子进行高通量测序,是识别和定量某种组织或细胞群在特定状态下小分子 RNA 长度分布和组成成分的一种重要方法。小分子 RNA 测序能分析不同

样品中的小分子 RNA 差异表达,进行小分子 RNA 的长度分布统计、分类注释及表达模式分析等;有助于在设计 amiRNA 表达载体时寻找特异靶标区域,为解释植物中小 RNA 的调节机制提供直接信息<sup>[3,17]</sup>。建议在比较不同生物样本的小 RNA 表达情况时使用相同的测序平台和文库构建方法,以保证比较的生物学相关性<sup>[60]</sup>。

尽管传统 RNAi 存在诸多问题, RNAi 技术介导的基因工程将逐渐成为植物抗胞囊线虫的重要手段。充分利用 RNAi 的优势在植物上表达胞囊线虫重要基因的特异 dsRNA,对植物抗胞囊线虫基因工程研究具有重大意义,有利于培育新型的转基因抗线虫作物。

激光捕获显微切割技术(laser capture microdissection, LCM)和基因芯片、线虫基因组测序及对关键基因的信息注释等都是基因功能研究的重要手段,其实验结果可为 RNAi 靶标基因的挑选提供依据。需要注意的是要在实验设计和结果分析过程中,对以上提出的应用 RNAi 技术的关键问题进行修正,做好生态风险评估,包括脱靶效应、非靶效应以及基因突变和多态性的影响评价,更加科学理性地看待和应用 RNAi 技术。

## 参考文献

- [1] 简恒. 植物线虫学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2011. (Jian H. Plant Nematology[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2011.)
- [2] 侯明生, 黄俊斌. 农业植物病理学[M]. 北京: 科学出版社, 2006. (Hou M S, Huang J B. Agricultural phytopathology[M]. Beijing: Science Press, 2006.)
- [3] Li J, Todd T C, Lee J, et al. Biotechnological application of functional genomics towards plant-parasitic nematode control[J]. Plant Biotechnology Journal, 2011, 9(9): 936-944.
- [4] 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(6669): 806-811.
- [5] Bakhiet M, Charlton W L, Urwin P E, et al. RNA interference and plant parasitic nematodes[J]. Trends in Plant Science, 2005, 10(8): 362-367.
- [6] Zamore P D, Haley B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs [J]. Science, 2005, 309(5740): 1519-1524.
- [7] Cerutti H. RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? [J]. Trends in Genetics, 2003, 19(1): 39-46.
- [8] Chapman E J, Carrington J C. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways [J]. Nature Reviews Genetics, 2007, 8(11): 884-896.
- [9] Kehr J, Buhtz A. Long distance transport and movement of RNA through the phloem[J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(1): 85-92.
- [10] Fagard M, Vaucheret H. Systemic silencing signal(s) [J]. Plant Molecular Biology, 2000, 43(2-3): 285-293.
- [11] Yoo B C, Kragler F, Varkonyi-Gasic E, et al. A systemic small RNA signaling system in plants [J]. Plant Cell, 2004, 16(8): 1979-2000.
- [12] Tabara H, Grishok A, Mello C C. RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence[J]. Science, 1998, 282(5388): 430-431.
- [13] Timmons L, Court D L, Fire A. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans* [J]. Gene, 2001, 263(1-2): 103-112.
- [14] Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested dsRNA [J]. Nature, 1998, 395(6705): 854.
- [15] Mello C C, Conte D J. Revealing the world of RNA interference [J]. Nature, 2004, 431(7006): 338-342.
- [16] Urwin P E, Lilley C J, Atkinson H J. Ingestion of double-stranded RNA by preparasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2002, 15(8): 747-752.
- [17] Hamamouch N, Li C, Hewezi T, et al. The interaction of the novel 30C02 cyst nematode effector protein with a plant beta-1, 3-endoglucanase may suppress host defence to promote parasitism [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(10): 3683-3695.
- [18] Kereszt A, Li D, Indrasumunar A, et al. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology [J]. Nature Protocols, 2007, 2(4): 948-952.
- [19] Klink V P, Kim K H, Martins V, et al. A correlation between host-mediated expression of parasite genes as tandem inverted repeats and abrogation of development of female *Heterodera glycines* cyst formation during infection of *Glycine max* [J]. Planta, 2009, 230(1): 53-71.
- [20] Cao D, Hou W, Song S, et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2009, 96(1): 45-52.
- [21] Collier R, Fuchs B, Walter N, et al. *Ex vitro* composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology [J]. Plant Journal, 2005, 43(3): 449-457.
- [22] Cho H J, Farrand S K, Noel G R, et al. High-efficiency induction of soybean hairy roots and propagation of the soybean cyst nematode [J]. Planta, 2000, 210(2): 195-204.
- [23] Li J, Todd T C, Trick H N. Rapid in planta evaluation of root expressed transgenes in chimeric soybean plants [J]. Plant Cell Reports, 2010, 29(2): 113-123.
- [24] Valentine T A, Randall E, Wypijewski K, et al. Delivery of macromolecules to plant parasitic nematodes using a tobacco rattle virus vector [J]. Plant Biotechnology Journal, 2007, 5(6): 827-834.
- [25] Sindhu A S, Maier T R, Mitchum M G, et al. Effective and specific in planta RNAi in cyst nematodes: expression interference of four parasitism genes reduces parasitic success [J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(1): 315-324.
- [26] Rosso M N, Jones J T, Abad P. RNAi and functional genomics in plant parasitic nematodes [J]. Annual Review of Phytopathology, 2009, 47: 207-232.
- [27] Steeves R M, Todd T C, Essig J S, et al. Transgenic soybeans expressing siRNAs specific to a major sperm protein gene suppress *Heterodera glycines* reproduction [J]. Functional Plant Biology, 2006, 33(11): 991-999.
- [28] Klink V P, Matthews B F. Emerging approaches to broaden resistance of soybean to soybean cyst nematode as supported by gene expression studies [J]. Plant Physiology, 2009, 151(3): 1017-1022.
- [29] Li J, Todd T C, Oakley T R, et al. Host-derived suppression of nematode reproductive and fitness genes decreases fecundity of *Heterodera glycines* [J]. Planta, 2010, 232(3): 775-785.

- [30] Fraser A G, Kamath R S, Zipperlen P, et al. Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference [J]. *Nature*, 2000, 408 (6810) : 325-330.
- [31] Maeda I, Kohara Y, Yamamoto M, et al. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi [J]. *Current Biology*, 2001, 11 (3) : 171-176.
- [32] Zipperlen P, Fraser A G, Kamath R S, et al. Roles for 147 embryonic lethal genes on *C. elegans* chromosome I identified by RNA interference and video microscopy [J]. *EMBO Journal*, 2001, 20 (15) : 3984-3992.
- [33] Kamath R S, Fraser A G, Dong Y, et al. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi [J]. *Nature*, 2003, 421 (6920) : 231-237.
- [34] Alkharouf N W, Klink V P, Matthews B F. Identification of *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode [SCN]) cDNA sequences with high identity to those of *Caenorhabditis elegans* having lethal mutant or RNAi phenotypes [J]. *Experimental Parasitology*, 2007, 115 (3) : 247-258.
- [35] Opperman C H, Bird D M. The soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*: a genetic model system for the study of plant-parasitic nematodes [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 1998, 1 (4) : 342-346.
- [36] Patel N. Functional analyses of cyst nematode parasitism genes [D]. Raleigh, USA: North Carolina State University, 2008.
- [37] 牛俊海. 南方根结线虫食道腺分泌蛋白基因 *MiMsp40* 的初步研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2011. (Niu J H. The preliminary study for *MiMsp40*, a secretory protein gene of southern root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) [D]. Beijing: China Agricultural University, 2011. )
- [38] Bakhtia M, Urwin P E, Atkinson H J. QPCR analysis and RNAi define pharyngeal gland cell-expressed genes of *Heterodera glycines* required for initial interactions with the host [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2007, 20 (3) : 306-312.
- [39] Chen Q, Rehman S, Smart G, et al. Functional analysis of pathogenicity proteins of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* using RNAi [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18 (7) : 621-625.
- [40] Shingles J, Lilley C J, Atkinson H J, et al. *Meloidogyne incognita*: Molecular and biochemical characterisation of a cathepsin L cysteine proteinase and the effect on parasitism following RNAi [J]. *Experimental Parasitology*, 2007, 115 (2) : 114-120.
- [41] Lilley C J, Bakhtia M, Charlton W L, et al. Recent progress in the development of RNA interference for plant parasitic nematodes [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2007, 8 (5) : 701-711.
- [42] Lilley C J, Goodchild S A, Atkinson H J, et al. Cloning and characterisation of a *Heterodera glycines* aminopeptidase cDNA [J]. *International Journal for Parasitology*, 2005, 35 (14) : 1577-1585.
- [43] Giacomotto J, Ségalat L. High-throughput screening and small animal models, where are we? [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2010, 160 (2) : 204.
- [44] Auer C, Frederick R. Crop improvement using small RNAs: applications and predictive ecological risk assessments [J]. *Trends in Biotechnology*, 2009, 27 (11) : 644-651.
- [45] 王志坤, 李文滨, 刘珊珊. RNA 干扰技术及在植物抗病研究中的应用 [J]. *大豆科学*, 2008, 27 (3) : 521-526. (Wang Z K, Li W B, Liu S S. Technology of RNAi and its application in disease resistance of plant [J]. *Soybean Science*, 2008, 27 (3) : 521-526. )
- [46] Urwin P E, Moller S G, Lilley C J, et al. Continual green-fluorescent protein monitoring of cauliflower mosaic virus 35S promoter activity in nematode-induced feeding cells in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1997, 10 (3) : 394-400.
- [47] Böckenhoff A, Grundler F M W. Studies on the nutrient uptake by the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* by in situ microinjection of fluorescent probes into the feeding structures in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Parasitology*, 1994, 109 (02) : 249-255.
- [48] Huang G, Allen R, Davis E L, et al. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene [J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America*, 2006, 103 (39) : 14302-14306.
- [49] Kimber M J, McKinney S, McMaster S, et al. flp gene disruption in a parasitic nematode reveals motor dysfunction and unusual neuronal sensitivity to RNA interference [J]. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 2007, 21 (4) : 1233-1243.
- [50] Goverse A, Biesheuvel J, Wijers G J, et al. In planta monitoring of the activity of two constitutive promoters, CaMV 35S and TR2, in developing feeding cells induced by *Globodera rostochiensis* using green fluorescent protein in combination with confocal laser scanning microscopy [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1998, 52 (4) : 275-284.
- [51] Miki D, Itoh R, Shimamoto K. RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice [J]. *Plant Physiology*, 2005, 138 (4) : 1903-1913.
- [52] Allen R S, Millgate A G, Chitty J A, et al. RNAi-mediated replacement of morphine with the nonnarcotic alkaloid reticuline in opium poppy [J]. *Nature Biotechnology*, 2004, 22 (12) : 1559-1566.
- [53] Lilley C J, Davies L J, Urwin P E. RNA interference in plant parasitic nematodes: a summary of the current status [J]. *Parasitology*, 2012, 139 (5) : 630-640.
- [54] Sukno S A, Mccuiston J, Wong M Y, et al. Quantitative detection of double-stranded RNA-mediated gene silencing of parasitism genes in *Heterodera glycines* [J]. *Journal of Nematology*, 2007, 39 (2) : 145-152.
- [55] Runo S. Engineering host-derived resistance against plant parasites through RNA interference: challenges and opportunities [J]. *Bio-engineered Bugs*, 2011, 2 (4) : 208-213.
- [56] Gheysen G, Vanholme B. RNAi from plants to nematodes [J]. *Trends in Biotechnology*, 2007, 25 (3) : 89-92.
- [57] Fairbairn D J, Cavallaro A S, Bernard M, et al. Host-delivered RNAi: an effective strategy to silence genes in plant parasitic nematodes [J]. *Planta*, 2007, 226 (6) : 1525-1533.
- [58] 龙海, 李芳荣, 李一农, 等. RNAi 在植物寄生线虫功能基因组研究中的应用 [J]. *植物保护*, 2011 (4) : 7-11. (Long H, Li F R, Li Y N, et al. RNA interference (RNAi) and its application to the study of functional genomics in plant parasitic nematodes [J]. *Plant Protection*, 2011 (4) : 7-11. )
- [59] Melito S, Heuberger A L, Cook D, et al. A nematode demographics assay in transgenic roots reveals no significant impacts of the Rhg1 locus LRR-Kinase on soybean cyst nematode resistance [J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10 : 104.
- [60] Toedling J, Servant N, Ciaudo C, et al. Deep-sequencing protocols influence the results obtained in small-RNA sequencing [J]. *Public Library of Science One*, 2012, 7 (2) : e32724.