

RNAi 在植物寄生线虫抗性研究中靶基因的选择策略

仲晓芳, 刘晓冬, 杨向东, 邢少辰, 袁翠平, 董英山

(吉林省农业科学院 农业生物技术研究所, 吉林 长春 130033)

摘要: RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种由 dsRNA 起始的转录后基因沉默机制。近年来, RNAi 技术在植物抗线虫研究方面得到广泛的应用。随着线虫基因组测序工作的不断推进,越来越多的线虫基因被开发继而当作 RNA 干扰的靶基因,其中以寄生线虫的生长发育或寄生过程建立等所必需的基因作为 RNAi 的目的基因是防治线虫的新方法,也是培育抗性品种的新选择。文章介绍了在 RNAi 研究中,所选择的植物寄生线虫基因的种类及其研究进展。

关键词: RNAi; 植物寄生线虫; 寄生; mRNA 代谢

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.04.0599

Target Genes Selection of RNAi in the Resistance to Plant-parasitic Nematodes

ZHONG Xiao-fang, LIU Xiao-dong, YANG Xiang-dong, XING Shao-chen, YUAN Cui-ping, DONG Ying-shan

(Agro-Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: RNAi(RNA interference) is a post-transcriptional gene silencing mechanism which is initiated by dsRNA. Recently, RNAi is widely applied in plant-parasitic nematode resistance. With the proceeding of nematode genome sequencing, more and more genes are explored as target genes for RNAi to improve the resistance to plant-parasitic nematodes. Among those genes, parasitism, development and mRNA metabolism related genes are suitable choices for RNAi and it is an alternative approach to engineer resistance to nematode. In this review, the selected genes and research progress are introduced.

Key words: RNAi; Plant-parasitic nematode; Parasitism; mRNA metabolism

RNA 干扰是指双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 导入细胞后被切割成 21 ~ 23 个核苷酸长度的短核苷酸双链,在其他作用因子的参与下能够特异的与其同源的 mRNA 结合并导致该同源 mRNA 降解,从而使得内源基因沉默^[1]。1995 年 RNAi 首次在秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中发现^[2],于 1998 年被 Fire 等证实^[3]以来相继在其他动物、植物和真菌中被证实。RNAi 所具有的特异性、稳定性、高效性、遗传性以及 ATP 依赖性等特性为人们研究未知基因的功能提供了新的反向遗传学手段^[4-9]。更重要的是在植物和线虫中, RNAi 具有系统性 RNAi 现象,即可在细胞之间传播。在 *C. elegans* 的实验中,子一代也可产生基因突变^[10]。截至 2011 年, Nematode. net 数据库中已经有超过一千万个 ESTs 序列和二十多万个来自 50 多种线虫的基因组序列。到 2013 年,在 Nematode. net 数据库中,测序和注释完成的线虫有 10 种,其中 2 种为植物寄生线虫,即北方根结线虫 (*Meloidogyne hapla*) 和南方根结线虫 (*M. incognita*)。线虫数据的不断完善,为 RNAi 技术在植物抗线虫的研究中提供了更多可利用的基因。

近年来, RNAi 技术通过多种方法在抗植物线虫方面得到了广泛的应用。如通过显微注射或饲喂以及浸泡等体外 RNAi,将 dsRNA 导入线虫,观察其表型来验证基因功能^[3,11-13];利用转化植物实现 RNA 干扰寄生线虫,通过植物介导 RNAi 来研究线虫的基因功能^[14-15];以及利用病毒诱导线虫 RNAi^[16],植物寄生线虫与寄主之间的互作关系等。除以上常用方法,仍然不断有新的方法被开发出来^[17]。

为了有效地防治植物寄生线虫,研究人员一直试图利用 RNAi 技术来阻断其生活史、阻止寄生过程的建立或者限制转录及翻译过程。过去的几年里,已经发掘了一批基因,作为沉默的靶标基因^[18]。这些基因主要可以分为 3 种:寄生所需基因、线虫发育基因和 mRNA 代谢相关基因。

1 寄生所需基因

寄生线虫在建立寄生过程中所需要的基因,是 RNA 干扰的首要选择基因,其优点是参与该过程的基因特异性较高。这类基因编码的蛋白,在线虫取

收稿日期:2013-12-26

基金项目:国家自然科学基金(31000141);中国博士后基金(2013M531004);吉林省博士后基金;吉林省农业科学院博士后基金。

第一作者简介:仲晓芳(1978-),女,博士,助理研究员,主要从事大豆分子生物学研究。E-mail:xfzhong649@163.com。

通讯作者:董英山(1963-),男,研究员,博士生导师,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:ysdong@cjaas.com。

食过程中可以通过口针分泌到植物组织中,参与线虫取食位点的形成和维持,这类基因的重要性在于可参与调控细胞分化、降解植物组织以利于线虫入侵和迁移等。包括过氧化物酶类、纤维素酶类、助消化酶类、其他功能蛋白等一批基因已经被证实具有显著的 RNAi 功能。

Mi8D05 效应因子能够与寄主中的水通道蛋白 TIP2 相互作用,调节巨细胞的水分与其他液体的运输,从而促进线虫的寄生。在拟南芥中表达该基因的 dsRNA,与野生型相比,能够减少南方根结线虫 (*M. incognita*) 的侵染率高达 90%^[19]。过氧化物酶和还原型辅酶 II (NADPH) 氧化酶在南方根结线虫 (*M. incognita*) 中与胞外基质密切相关,通过体外实验证实这种酶类经 dsRNA 干扰后可显著降低根结的数量^[20]。由 β -1-4 纤维素内切酶编码的 eng 蛋白,在大豆胞囊线虫 (*Heterodera Glycines*)、南方根结线虫 (*M. incognita*) 和马铃薯金线虫 (*Globodera rostochiensis*) 中均存在,它能降解植物组织从而利于线虫入侵植物以及在寄主内迁移,将其进行 RNA 干扰之后,能够显著降低线虫在植物中的寄生^[21-23]。Mipcpl-1 半胱氨酸蛋白酶,是一种有助于消化功能的酶类,在南方根结线虫 (*M. incognita*) 中将其 RNA 干扰之后,约 60% 的雌虫不能产卵^[24]。16D10,是南方根结线虫 (*M. incognita*)、爪哇根结线虫 (*M. javanica*)、花生根结线虫 (*M. arenaria*) 和北方根结线虫 (*M. hapla*) 4 种根结线虫寄生过程建立所需基因,编码一种分泌多肽,这种肽能够激发植物根的生长,还能作为植物转录因子的配基行使功能。体内和体外 RNAi 实验均表明 16D10 可以有效抵抗这 4 种根结线虫^[25]。在大豆根中表达来源于南方根结线虫 (*M. incognita*) 4 种剪接因子或整合酶,其中酪氨酸磷酸酶基因和线粒体 stress-70 蛋白质前体基因,能够显著减少根结的数量^[26]。基于 RNAi 功能分析表明食管分泌腺中表达的谷胱甘肽 S 转移酶是线虫寄生过程中所分泌的蛋白,也是完成生活史所必须的。将用该基因的 dsRNA 饲喂的线虫侵染番茄,6 周后与对照相比能够显著降低寄主的胞囊数量^[27]。马铃薯金线虫 (*G. rostochiensis*) 分泌的一种头感器蛋白,对于线虫寄主的定位至关重要,将此基因进行 RNAi 后将有效降低线虫的定位和入侵^[21]。大豆胞囊线虫中存在类似拟南芥信号肽 CLE (CLAVATA3/ESR) 家族的腺体分泌蛋白 Hg-syv-46,参与调控分生组织细胞增生与分化之间的平衡,经 RNAi 后在线虫取食部位干扰植物细胞的正常分化模式^[22]。此外,还有类似泛素蛋白的 SKP-1、Ring-H2,调节寄主蛋白降解以利于寄生^[14];

巨噬细胞甘露糖受体、聚蛋白多糖等经 RNAi,均能影响靶基因的表达^[28]。

2 线虫生长发育相关基因

线虫门中对其生长发育起重要作用的基因有些是非常保守的,其中有一些基因在秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 中有 RNAi 表型。在选择 RNA 干扰抑制植物寄生线虫目标基因时,可基于秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 中的已知的胚胎发育、不孕或者不育的 RNAi 表型的同源序列来选择。研究发现,南方根结线虫 (*M. incognita*) 的基因组有 1 083 个基因家族,在秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 中它们的种间同源性基因都有 RNAi 致死表型^[29]。香蕉穿孔线虫 (*Radopholus similis*) 和大豆胞囊线虫 (*H. glycines*) 中分别鉴定了与之同源的候选靶基因 659 和 1 508 个^[30-31]。在这些基因中,与胚胎形成、幼龄虫发育和繁殖相关的基因,尤为重要,它们与线虫是否能完成其生活史直接相关。酰胺样多肽 FLP (FMR-Famide Like Peptides),在多种植物寄生线虫中存在,并且在不同线虫中为具有相似结构的同系物,功能也类似。对南方根结线虫 (*M. incognita*) 进行干扰后会影响到线虫的孵化、在土壤中的迁移、取食和交配^[32]。果糖二磷酸醛缩酶 HgALD 在大豆胞囊线虫中编码果糖二磷酸醛缩酶,在果糖转化为能量过程中起重要作用,尤其对线虫侵入寄主起重要作用的肌动蛋白的能动性更为重要。在大豆根中表达 HgALD 基因的 RNAi 片段,使得成熟雌虫中 HgALD 的表达量减少 58%,这一结果表明,在大豆胞囊线虫中沉默果糖二醛缩酶能够显著降低雌虫的成熟度^[33]。几丁质合成酶在花生根结线虫 (*M. artiellia*) 卵壳中负责几丁质合成,该基因被 RNAi 抑制后,能够延迟线虫卵的孵化^[34]。大豆胞囊线虫中一种主要精子蛋白 MSP (major sperm protein),将其干扰后能够显著降低大豆胞囊线虫 (*H. glycines*) 的繁殖能力,而且后代线虫也表现出繁殖能力缺陷^[35]。这一结果通过转基因大豆介导的 dsRNAi 得到了证实。Kimber 等^[36]通过 RNAi 实验证明了马铃薯白色胞囊线虫 (*G. pallida*) 的 flp 基因被破坏表现出线虫运动功能障碍和非正常的神经元过敏性。Alkharouf、Klink、Li 等^[30,37-39]通过一系列实验,利用生物信息学等方法在大豆胞囊线虫 (*H. glycines*) 中找到了与 *C. elegans* 中 RNAi 致死或者不育基因的同源基因,通过体外 RNAi 实验,证实编码核糖体蛋白基因和剪接因子基因 Hg-rps-23、Hg-rps-3a、Hg-rps-4、Hg-sp1-1、Hg-cpn-1、Hg-prp-17 等基因,经 RNAi,抑制雌虫发育,可显著减少大豆胞囊线虫的

胞囊数量。一些管家基因和效应因子的沉默,也能显著降低寄主的被侵染率^[40]。

3 寄主参与调控的 mRNA 代谢相关基因

在线虫生长发育过程中,参与 mRNA 代谢的基因在抑制线虫发育或者繁殖方面也是非常有效的,因为参与 mRNA 代谢的基因可能对 RNAi 更敏感。如上文提到的编码核糖体蛋白基因 *Hg-rps-23*、*Hg-rps-3a*、*Hg-rps-4*、剪接因子如 *Hg-spk-1*、*Hg-prp-17*,在大豆不同生长阶段参与 mRNA 代谢,其中 *Hg-rps-23* 基因,经双链 RAN 干扰片段浸泡的大豆胞囊线虫 (*H. glycines*) pi-J2 龄虫,经过 5 d 培养后致死率超过 95%^[30];在大豆根中表达 *Hg-rps-3a*、*Hg-rps-4*、*Hg-spk-1* 反向串联重复序列,可使 *H. glycines* 胞囊数量减少 81%~88%^[37]。*Hg-prp-17*,在转基因大豆中 RNAi 后经线虫侵染,导致每克根部组织胞囊和卵量数显著减少^[38-39]。Steeves 等^[35]研究的胞囊线虫主要精子蛋白 MSP,其干扰片段在大豆根中表达后,每克根组织中胞囊数量可减少 68%,并且其后代的繁殖能力也会下降。

4 寄主基因沉默提高线虫抗性

在拟南芥中,脂氧合酶 13-LOXs (13-lipoxygenases) 与育性和花发育密切相关,其中 2 个密切相关的成员 LOX3 和 LOX4 与拟南芥的抗线虫反应应答有关^[41-42]。组织特异性定位实验表明,当 J2 龄虫到达维管束,线虫通过胆管与多合体与寄主互作的早期,LOX3 基因被诱导表达。在成熟的巨细胞也有表达,尤其是巨细胞周围以及围绕雌体的细胞中高表达;线虫的侵染也能诱发 LOX4 基因启动子的表达;*lox3* 突变体与野生型相比表现出线虫的易感性降低,导致雌虫数量降低。而 *lox4* 对线虫的易感性增加,表现为雌虫和卵的数量增加或雌虫/雄虫比例增加。LOX3 和 LOX4 虽为同系物,但是经 RNAi 后对线虫侵染的反应截然不同,可以根据二者的不同代谢途径,寻找与线虫抗性相关的基因,加以应用。虽然寄主基因参与的 RNAi 基因目前研究较少,不过随着新基因的挖掘和技术的不断进步,将来可能会成为新的防治线虫有效方法。

5 展 望

生物技术是作物种质资源创新利用所采用的重要手段之一。开拓新的抗性基因来源对进一步提高作物线虫抗性水平十分必要。RNAi 技术的应用大大拓宽了研究的思路和方法。RNAi 技术的实

施,已经找到了多种在线虫生活史起关键作用基因,部分基因已经通过转基因植物介导,能够起到防控线虫的目的。研究者在不断的利用功能基因组学方法去寻找控制线虫更合适的基因作为 RNAi 的靶标基因,以使其对环境更为友好以及与非靶标互作最小化。

参考文献

- [1] Bernstein E, Caudy A A, Hammond S M, et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference[J]. Nature 2001, 409:363-366.
- [2] Guo S, Kempthues K. Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed[J]. Cell, 1995, 81:611-620.
- [3] 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.
- [4] Kawasaki H, Taira K. Short hairpin type of dsRNA that are controlled by tRNA(Val) promoter significantly induce RNAi mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31:7002-7007.
- [5] 石智,符立梧. RNAi 及其在肿瘤研究中的应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31:492-499. (Shi Z, Fu L W. RNAi and its application in tumor study[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2004, 31:492-499.)
- [6] Caplen N J, Fleenor J, Fire A, et al. dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells[J]. Gene, 2000, 252:95-105.
- [7] 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 Journal, 1997, 16:4738-4745.
- [8] Zamore P D, Tuschli T, Sharp P A, et al. RNAi: dsRNA directs the ATP dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals [J]. Cell, 1999, 101:25-33.
- [9] Jones L, Ratcliff F, Baulcombe D C. RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires *Met1* for maintenance [J]. Current Biology, 2001, 11:747-757.
- [10] Winston W M, Molodowitch C, Hunter C P. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1 [J]. Science, 2002, 295:2459-2459.
- [11] Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested dsRNA [J]. Nature, 1998, 395:854.
- [12] Timmons L, Court D L. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans* [J]. Gene, 2001, 263:103-112.
- [13] Mello C C, Conte D J. Revealing the world of RNA interference [J]. Nature, 2004, 431:338-342.
- [14] 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, 60:315-324.
- [15] 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.
- [16] Pramod P K, Heinz R, Yeckel G, et al. A virus-induced gene silencing method to study soybean cyst nematode parasitism in *Glycine max* [J]. BMC Research Notes, 2013, 6: 255.
- [17] Dinh P T, Knoblauch M, Elling A A. Non-destructive imaging of plant-parasitic nematode development and host response to nematode pathogenesis [J]. Phytopathology, 2014, 104: 497-506.
- [18] Li J R, Todd T, Lee J, et al. Biotechnological application of functional genomics towards plant-parasitic nematode control [J]. Plant Biotechnology Journal, 2011, 9: 936-944.
- [19] Xue B, Hamamouch N, Li C, et al. The 8D05 parasitism gene of *Meloidogyne incognita* is required for successful infection of host roots [J]. Phytopathology, 2013, 103: 175-181.
- [20] Bakhtia M, Charlton W, Atkinson H J, et al. RNA interference of dual oxidase in the plant nematode *Meloidogyne incognita* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2005, 18: 1099-1106.
- [21] Chen Q, Reham S, Smant G, et al. Functional analysis of pathogenicity proteins of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* using RNAi [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2005, 18: 621-625.
- [22] Bakhtia M, Urwin P, 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: 306-312.
- [23] Hu L, Cui R, Sun L, et al. Molecular and biochemical characterization of the β -1, 4-endoglucanase gene Mj-eng-3 in the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* [J]. Experimental Parasitology, 2013, 135: 15-23.
- [24] Shingles J, Lilley C, Atkinson H J, et al. *Meloidogyne incognita*: molecular and biochemical characterization of a cathepsin L cysteine proteinase and the effect on parasitism following RNAi [J]. Experimental Parasitology, 2007, 115: 114-120.
- [25] 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 Sciences of the USA, 2006, 103: 14302-14306.
- [26] Ibrahim H M, Alkharouf N W, Meyer S L, et al. Post-transcriptional gene silencing of root-knot nematode in transformed soybean roots [J]. Experimental Parasitology, 2011, 127: 90-99.
- [27] Dubreuil G, Magliano M, Deleury E, et al. Transcriptome analysis of root-knot nematode functions induced in the early stages of parasitism [J]. New Phytologist, 2007, 176: 426-436.
- [28] Urwin P E, Lilley C J, Atkinson H J. Ingestion of double stranded RNA by pre-parasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2002, 5: 747-752.
- [29] Abad P, Gouzy J, Aury J, et al. Plant parasitism in metazoans: insights from the *Meloidogyne incognita* nematode genome [J]. Nature Biotechnology, 2008, 26: 909-915.
- [30] 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: 247-258.
- [31] Jacob J, Mitreva M, Vanholme B, et al. Exploring the transcriptome of the burrowing nematode *Radop holussimilis* [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2008, 280: 1-17.
- [32] Jacob J, Mitreva M, Vanholme B, et al. Utility of host delivered RNAi of two FMRF amide like peptides, flp-14 and flp-18, for the management of root knot nematode, *Meloidogyne incognita* [J]. Plos One, 2013, 8: 80603.
- [33] Youssef R M, Kim K H, Haroon S A, et al. Post-transcriptional gene silencing of the gene encoding aldolase from soybean cyst nematode by transformed soybean roots [J]. Experimental Parasitology, 2013, 134: 266-274.
- [34] Fanelli E, DiVito M, Jones J T, et al. Analysis of chitin synthase function in a plant parasitic nematode, *Meloidogyne artiellia*, using RNAi [J]. Gene, 2005, 349: 87-95.
- [35] 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: 991-999.
- [36] 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]. FASEB Journal, 2007, 21: 1233-1243.
- [37] Klink V, Kim K, 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: 53-71.
- [38] Li J, Todd T C, Oakley T R, et al. Host-derived suppression of nematode reproductive and fitness genes decreases fecundity of *Heterodera glycines* Ichinohe [J]. Planta, 2010, 232: 775-785.
- [39] Li J, Todd T C, Trick H N. Rapid in planta evaluation of root expressed transgenes in chimeric soybean plants [J]. Plant Cell Report, 2010, 29: 113-123.
- [40] Kyndt T, Ji H, Vanholme B, et al. Godelieve gheysen transcriptional silencing of RNAi constructs against nematode genes in Arabidopsis [J]. Nematology, 2013, 15: 519-528.
- [41] Ozalvo R, Cabrera J, Escobar C, et al. Two closely related members of Arabidopsis 13-LOXs, LOX3 and LOX4, reveal distinct functions in response to plant-parasitic nematode infection [J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 2014, 15: 319-332.
- [42] Caldeleri D, Wang G, Farmer E E, et al. Arabidopsis *lox3 lox4* double mutants are male sterile and defective in global proliferative arrest [J]. Plant Molecular Biology, 2011, 75: 25-33.