

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00041

# 植物免疫反应中的小 RNA

徐凌, 徐明良

中国农业大学国家玉米改良中心, 农业部作物基因组学与遗传改良重点开放实验室, 北京 100193

**摘要:** 植物中的小 RNA 参与多种生物学过程, 依据其起源及前体结构的不同主要分为两类: 微小 RNA (miRNAs) 和小干扰 RNA (siRNAs), 它们的长度通常为 21~24 个核苷酸, 在生物合成途径以及作用机制等方面存在差异。病原物侵染植物后常通过诱导或抑制小 RNA 分子来调节抗病相关基因的表达, 进而调控植物与病原物的互作反应。文章就小 RNA 的生物合成、作用途径及其在植物与病原物互作中的调控机制等方面进行了综述。

**关键词:** 小 RNA; 合成代谢; 植物病原菌互作; 抗病毒

## The small RNAs in plant immunity

XU Ling, XU Ming-Liang

National Maize Improvement Center of China, Key Laboratory of Crop Genomics and Genetic Improvement of Ministry of Agriculture, China Agricultural University, Beijing 100193, China

**Abstract:** Small RNAs are involved in a multitude of biological processes in plants. Based on their origins and precursor structures, small RNAs can be divided into two major classes: microRNAs (miRNAs) and small interference RNAs (siRNAs). Small RNAs are typically 21-24 nucleotide (nt) long, and differ in both biogenesis and biological function. In the pathogenic process, pathogens can either induce or suppress the synthesis of small RNAs, which, in turn, regulate the expression of pathogenesis-related genes to mediate diverse plant-pathogen interactions. The biogenesis and biological functions of small RNAs, together with possible regulation mechanisms underlying the host-pathogen interactions, are summarized in this review.

**Keywords:** small RNAs; biogenesis; plant-pathogen interaction; antiviral immunity

小RNA是真核生物中广泛存在的一类非编码的RNA分子。目前已发现小RNA参与植物的代谢调控、时序发育、细胞凋亡、激素分泌及生物和非生物胁迫反应等过程, 在维持植物基因组的稳定性和完整性中起重要作用。关于小RNA诱导基因沉默的现象

最早于 1928 年报道: 烟草环斑病毒侵染烟草后会导导致感染部位叶片的坏死, 同时会诱导烟草非感染部位产生抗病毒免疫力, 避免次级侵染<sup>[1]</sup>。当时并不知道产生这种现象的原因, 后来证实是烟草环斑病毒诱导烟草产生RNA沉默信号, 特异性地沉默烟草环

收稿日期: 2011-04-24; 修回日期: 2011-06-16

基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”计划)项目(编号: 2006AA10A107)资助

作者简介: 徐凌, 博士研究生, 专业方向: 作物遗传育种。E-mail: xu\_ling2006@126.com

通讯作者: 徐明良, 教授, 博士生导师, 研究方向: 作物功能基因组学。E-mail: mxu@cau.edu.cn

网络出版时间: 2011-10-25 9:49:27

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20111025.0949.002.html>

斑病毒的基因组 RNA<sup>[11]</sup>。Izant 等<sup>[2]</sup>研究发现, Thymidine kinase 基因(*TK*)的反义转录本会干扰 *TK* 基因的表达, 表达量下降 4 倍。Napoli 等<sup>[3]</sup>将查尔酮合成酶(Chalcone synthase, *CHS*)基因转入矮牵牛中, 矮牵牛的花瓣颜色没有预想的加深, 反而变淡, 甚至出现全白色花瓣, 后经研究证实是 *CHS* 基因的转入阻碍了花青素的合成, 当时将这种现象称为共抑制。上世纪 90 年代在植物中发现 RNA 能抑制病毒的感染<sup>[4]</sup>。1993 年在线虫中发现了第一个 miRNA—*lin-4*<sup>[5,6]</sup>, 它通过调节靶基因 *lin-14* 的表达来调节线虫的发育时序<sup>[5,7]</sup>。Fire 等<sup>[8]</sup>发现内源性双链 RNA 能诱导基因沉默, 提出了 RNA 干扰的假说。Zamore 等<sup>[9]</sup>认为, 小 RNA 干扰途径中的关键步骤是许多物种调控内源基因表达所共有的机制, 这一观点已被人们广泛接受。近年来, 植物中的小 RNA 研究进展迅速, 发现了大量的 miRNAs 及 siRNAs。小 RNA 参与抗病毒免疫机制已有较深入的研究, 但其参与抗细菌和真菌性病害的免疫机制还有待进一步探索。

## 1 小 RNA 的生物合成

小 RNA 的生物合成涉及非常复杂的调控网络, 对此已进行了深入的研究。该网络有许多成分的参与, 如 RNA 聚合酶 (RNA polymerase, *pol*)、Dicer 酶(植物中是 Dicer-like 蛋白, *DCL*)、Argonaute 蛋白(*AGO*)、RNA-dependent RNA polymerases(*RDRs* or *RdRPs*)、exportin-5 homolog *HASTY*(*HST*)、Hyponastic leaves 1(*HYL1*)、Hua enhancer 1(*HEN1*) 等。其中 Dicer 酶、AGO 蛋白、*RDRs* 3 个家族成员的功能高度冗余, 不同拷贝的具体功能还有待进一步验证。虽然科学界将小 RNA 分成 miRNAs 和 siRNAs 两种, 但两者之间界限很模糊, 其最本质的区别在于起源上: siRNAs 由长双链 RNA 加工而来, 而 miRNAs 则由单链茎环结构 RNA 加工而成。另外, 还有其他的一些辅助区分标准, 如在物种间 miRNAs 比 siRNAs 保守性高, miRNAs 主要由 Dicer1(植物中是 *DCL1*)加工而来等, 但这些标准也并不是绝对的<sup>[10]</sup>。

### 1.1 参与小 RNA 合成的基本成分

#### 1.1.1 Dicer 酶

*DCL* 蛋白(Dicer-like 核酸内切酶)属于 RNase 蛋白

家族, 是一类特异性剪切双链 RNA(double-stranded RNAs, dsRNAs)产生小 RNA 的酶<sup>[11]</sup>。Bernstein 等<sup>[12]</sup>分析果蝇的 Dicer 酶后提出它是 RNA 诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, *RISC*)的一部分, 起切割 dsRNAs 的作用, 在线虫中发现了 Dicer 酶的同源基因<sup>[13]</sup>。在拟南芥中发现了 *DCL1*、*DCL2*、*DCL3* 和 *DCL4* 共 4 种 Dicer 酶, 切割后分别产生 21nt、22nt、24nt 和 21nt 长的小 RNA, 它们的功能高度冗余, 这 4 种 Dicer 酶相互配合, 协同作用<sup>[14,15]</sup>。来源于病毒的小 RNA(virus-derived siRNA, *vsiRNA*)主要由 *DCL4* 和 *DCL2* 切割而来。

#### 1.1.2 AGO 蛋白

AGO 蛋白也称为 PPD 蛋白<sup>[16]</sup>, 其功能高度冗余, 是 *RISC* 的主要成分之一, 它包括两个亚家族: AGO 和 Piwi 亚家族(该亚家族目前只在动物中发现)。在拟南芥中发现了 10 种 AGO 蛋白<sup>[15]</sup>。有报道称, 在拟南芥中 AGO1、AGO2<sup>[17]</sup>、AGO5 和 AGO7 都参与抗病毒反应<sup>[18]</sup>。有研究者发现 AGO4 参与 DNA 病毒的转录沉默机制<sup>[19]</sup>。

#### 1.1.3 RNA 依赖的 RNA 聚合酶

拟南芥中有 6 种 *RdRPs*。许多真核生物中都存在编码 *RdRPs* 的基因, 参与合成 mRNA 和基因组的复制过程。它们能以目标 RNA 为模板, 以 siRNA 单链为引物合成新的 dsRNA<sup>[20]</sup>。1998 年在番茄中克隆了第一个 *RdRP* 基因<sup>[21]</sup>。近年来发现 *RdRPs* 还参与小 RNA 的合成。线虫<sup>[22]</sup>、动物<sup>[23]</sup>、植物<sup>[24]</sup>中内源小 RNA 的合成都需要 *RdRPs* 的参与。在拟南芥中, *vsiRNA* 需要在寄主 *RdRPs* 的参与下大量扩增后才能有效的抵抗病毒的侵染<sup>[18]</sup>。

### 1.2 microRNAs 的生物合成

植物中, miRNAs 由内源 *miRNAs* 基因编码产生<sup>[25]</sup>。*miRNAs* 基因在 RNA 聚合酶(通常是 *pol*<sup>[10,18]</sup>)的作用下转录生成单链初级 miRNAs。在细胞核中, 初级 miRNAs 折叠成发卡结构<sup>[18]</sup>, 在 *DCL1* 的参与下加工形成前体 miRNA, 随后由 *DCL1*<sup>[26-28]</sup>或 *DCL4*<sup>[27]</sup>进一步加工形成 20~22nt<sup>[27]</sup>的双链 miRNA/ miRNA\* 复合体(该复合体产生于茎环结构中反向配对的两条链, 通常 5'端热力学不稳定的 miRNA 单链与 AGO 及相关蛋白结合形成 *RISC*<sup>[22]</sup>), 之后在 *HEN1* 的作用

下其 3'端的尿嘧啶被甲基化并借助HST蛋白从细胞核输出到细胞质中。

### 1.3 siRNAs的生物合成

siRNAs通常长度为 21~24nt<sup>[29]</sup>, 它的前体是长双链RNA<sup>[26,30]</sup>, 在DCL酶的参与下剪切形成双链siRNAs复合体, 热力学不稳定的那条指导链进入RISC发挥作用。siRNAs的前体通常由基因的反义转录或RDRs介导的复制形成的<sup>[27]</sup>, 基因组的任何部位都可以产生siRNAs, 可以内源产生也可以外源产生。植物中主要有4种类型的siRNAs: 反式作用小RNA(*trans-acting* siRNAs, ta-siRNAs)、重复序列相关的小RNA(repeat-associated siRNAs, ra-siRNAs)、天然反义小RNA (natural antisense transcript-derived siRNAs, nat-siRNAs)和长干扰小RNA(long siRNAs, lsiRNAs)。编码ta-siRNAs的*TAS*(*trans-acting* siRNA gene)基因在RNA聚合酶的催化下转录形成单链初级转录物, 随后被miRNAs指导的沉默复合体剪切形成初级加工产物, 再在RDR6及Suppressor of gene silencing 3(SGS3)等的作用下以初级加工产物为模板合成双链RNA, 最后在DCL4及dsRNA-binding protein 4(DRB4)等的作用下产生 ta-siRNAs<sup>[31]</sup>。ra-siRNAs通常来源于转座子、重复元件或异染色质区域<sup>[31]</sup>。nat-siRNAs由天然反义转录物(natural antisense transcripts, NATs)加工而来<sup>[32]</sup>。2007年在拟南芥中发现了 30~40nt的 lsiRNAs, 它的加工需要DCL1、DCL4、AGO7、HYL1、HEN1、HST1、RDR6和pol 共同参与<sup>[26]</sup>, 生物合成过程的关键步骤与其他siRNAs相似。

## 2 小RNA的作用机制

小RNA既可以在细胞中生成并发挥功能, 也可以在细胞间传递。小RNA能形成RISC, 调控mRNA的降解、抑制翻译、调节DNA或组蛋白甲基化(转录沉默), 并能稳定异染色质。一些siRNAs或miRNAs与靶mRNA通过碱基互补配对原则完全或不完全配对结合后对mRNA进行剪切。另一些siRNAs、miRNAs不能剪切靶mRNA, 而是通过调用其他的一些蛋白与RISC一起作用来抑制DNA转录或靶mRNA的翻译<sup>[18]</sup>。miRNAs的末端高度保守, 通常结合mRNA的 3'-UTR区域, 且特异性很高。

siRNAs的末端变异较多, 结合位点可以是mRNA的任何部位。miRNAs识别mRNA的关键位点是 2~8 个核苷酸, 通常该关键位点之外的碱基完全配对时启动miRNA对mRNA的降解, 若不完全配对则抑制mRNA的翻译。动物miRNAs的作用机制与植物不同, 它的主要作用途径是抑制mRNA的翻译。动植物中的小RNA都是可以移动的。在植物中能通过维管束移动, 它们的运输具有源库的关系, 在细胞间传递并触发非细胞自主性基因沉默<sup>[33]</sup>。siRNAs的移动对于抗病毒反应及稳定转座子非常重要, miRNAs的移动对于植物生理信号的传递很重要<sup>[33]</sup>。在植物中siRNAs通常是从茎运输到根, 有些小RNA运输到分生组织中, 有些运输到花粉或发育的种子中, 所以这些移动的小RNA可以介导子代的表现遗传学修饰<sup>[34]</sup>。小RNA在植物体内长距离运输需要RDR6、SGS3等的参与<sup>[33]</sup>, 短距离运输需要DCL4的参与<sup>[35]</sup>。之前大部分观点都支持小RNA以双链形式运输, 但也有部分学者认为其运输形式为单链。然而总体上看人们对小RNA运输途径还不够了解, 是否结合蛋白载体尚不清楚, 主动或被动运输类型、信号传导途径等也有待进一步研究。

## 3 小RNA参与植物的抗病反应

病原菌侵染植物后会诱导植物的细胞壁生物强化、胼胝质沉积、木质素合成、几丁质酶和葡聚糖酶积累等。植物抵抗病原菌主要有两道免疫屏障: 第一道免疫屏障即基础免疫反应, 病原的相关分子模式(Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)或微生物相关的分子模式(Microbe-associated molecular patterns, MAMPs)触发的免疫反应(PAMP-triggered immunity, PTI); 第二道免疫屏障是效应因子触发的免疫反应(Effector-triggered immunity, ETI)。细菌、真菌等侵染植物后首先触发植物的PTI反应, 当病原菌进化并越过植物的基础免疫防线同时向植物体内释放效应因子时, 植物表现感病。随后, 植物进化出相应的R蛋白识别效应因子, 触发植物的ETI反应, 表现抗病。研究者们先后提出4种假说解释植物与病原菌的互作反应。上世纪40年代, Flor等<sup>[36]</sup>提出基因对基因假说, 他们认为病原体含有*Avr*(无毒)基因及*Vir*(毒性)基因。植物的R蛋白能特异性识别病原菌释放的AVR蛋白, 从而激发植

物的抗病反应,使植物表现抗病<sup>[37]</sup>。Keen等<sup>[38]</sup>提出了激发子-受体模型,该模型在生化水平上完善了基因对基因假说,他们认为*Avr*基因编码的蛋白可以与R蛋白相互识别,从而激发植物防御反应相关的一系列基因的表达,使植物产生抗性。但之后的研究发现,许多抗病基因不符合基因对基因假说,比如抗番茄细菌性斑点病*Pto*基因,它发挥抗病功能还需要*Prf*基因的参与<sup>[37]</sup>。鉴于此, Van der Biezen等<sup>[37]</sup>提出了防卫模型,认为AVR蛋白进入植物细胞后能与卫兵蛋白相互作用,导致卫兵蛋白构型的变化,这种变化能被R蛋白所识别,从而激发植物的防御反应,表现抗病。该模型认为卫兵蛋白是病原菌侵染植物所必需的,但随着研究的深入,研究者发现这个假设存在缺陷。为此, Zhou等<sup>[39]</sup>提出了诱饵模型,该模型认为诱饵蛋白是由寄主的靶标蛋白进化而来,与靶标蛋白高度相似,病原菌的效应因子攻击靶标蛋白有利于其自身的生长发育,但攻击诱饵蛋白对其生长无益反而会激发R蛋白,从而触发植物的防御反应。近年来,在植物与病原菌的互作反应中发现了许多抗病相关小RNA的参与(表 1),从而进一步丰富发展了植物与病原菌互作反应机制。

### 3.1 植物与细菌、真菌互作中的小 RNA

在拟南芥中发现的第一个参与PTI反应的

miRNA是miR393(图 1A),它是由细菌的鞭毛蛋白诱导产生的,通过降解生长素受体*TIR1*(Transport inhibitor response 1)基因的mRNA,同时降低*TIR1*的同族体*AFB2*(auxin signaling F-box 2)和*AFB3* (auxin signaling F-box 3)基因的表达量,达到抵抗丁香假单胞菌侵染的目的<sup>[27,31,40~42]</sup>。另外,细菌侵染后miR167和miR160的表达量也上调,它们抑制生长素信号途径中的转录因子*ARF*(auxin-response factor)的活性,从而使植株抗病<sup>[31,41]</sup>。根癌土壤杆菌侵染植物后,能诱导产生miR393及miR167,抑制生长素信号途径,该途径被抑制后不利于根癌土壤杆菌的致瘤作用<sup>[49]</sup>。miR173能剪切*TAS1*(*trans-acting* siRNA gene 1)和*TAS2*(*trans-acting* siRNA gene 2)的转录本,从而影响生长素信号途径<sup>[45,47]</sup>; miR390通过剪切*TAS3*(*trans-acting* siRNA gene 3)进一步调控*ARF3*(auxin response factor 3)和*ARF4*(auxin response factor 4),从而作用于生长素信号途径<sup>[47]</sup>,但它们在抗病过程中的具体作用尚待进一步验证。另外,植物的防御反应会受到植物体内其他多种激素水平的调节,如活体营养型病原菌会触发水杨酸调节的防御反应途径,坏死营养型病原菌通常触发茉莉酸/乙烯调节的抗病反应途径。在进化过程中,病原菌产生沉默抑制子能抑制寄主的沉默信号途径<sup>[46]</sup>,如丁香假

表 1 病原菌诱导植物产生的小 RNA 种类,对应的靶基因和功能

小 RNA 名称	靶基因	小 RNA 的功能	参考文献
miR393	<i>TIR1</i> , <i>AFB2</i> , <i>AFB3</i>	与生长素信号途径及抗丁香假单胞杆菌相关	[27,31,40~42]
miR398	<i>CSD1</i> , <i>CSD2</i>	与活性氧含量及抗细菌侵染相关	[43]
miR167	<i>ARF6</i> , <i>ARF8</i>	与生长素信号途径及抗细菌侵染相关	[31,41]
miR160	<i>ARF10</i> , <i>ARF16</i> , <i>ARF17</i>	与生长素信号途径及抗细菌侵染相关	[31,41]
miR1885	TIR-NBS-LRR 类基因	与抗病毒相关	[44]
miR158	TIR-NBS-LRR 类基因	与抗病毒相关	[44]
miR825	锌指蛋白同源基因家族	细菌侵染后 miR825 表达量降低,与抗细菌侵染有关	[27,45]
miR162	<i>DCL1</i>	细菌侵染后 miR162 表达量降低,提高 DCL1 的含量,增强 PTI	[46]
miR168	<i>AGO1</i>	细菌侵染后 miR168 表达量降低,提高 AGO1 的含量,增强 PTI	[46]
miR173	<i>TAS1</i> , <i>TAS2</i>	与生长素信号途径相关	[45,47]
miR390	通过切割 <i>TAS3</i> , 从而作用于 <i>ARF3</i> 和 <i>ARF4</i>	与生长素信号途径相关	[47]
nat-siRNAATGB2	<i>PPRL</i>	与 RPS2 途径相关	[27,31,41,42]
AtlsiRNA-1	<i>AtRAP</i>	与抗丁香假单胞杆菌相关	[26]
RPP4 位点相关的 siRNAs	<i>RPP4</i>	与抗病相关	[48]



单胞杆菌分泌的AvrPtoB能抑制miR393的产生<sup>[46]</sup>。

miR398 是第一个被报道的在非生物胁迫条件下表达量降低的miRNA, 它抑制Cu/Zn超氧化物歧化酶基因*CSD1* 的表达, 植物受丁香假单胞杆菌(含无毒基因*avrRpm1* 或*avrRpt2*)侵染后, miR398的含量降低, 导致*CSD1* 的表达量升高, 使植物体内活性氧水平升高<sup>[43]</sup>。细菌侵染也会导致miR162 和miR168 含量的降低, 继而使DCL1 和AGO1 含量减少, 由此增强植物的PTI反应<sup>[46]</sup>。同时, miR825 也响应细菌侵染而抑制自身表达, 它作用的靶标是锌指蛋白同源基因家族, 但它的功能还有待进一步验证<sup>[27,45]</sup>。

在植物中发现的第一个参与ETI反应的内源siRNA是nat-siRNAATGB2(图 1B), 它受丁香假单胞杆菌(含无毒基因*avrRpt2*)诱导, 产生于GTP结合蛋白基因*ATGB2* 和PPR(pentatricopeptide repeats)蛋白类似基因*PPRL*的重叠区。由于*PPRL*基因负调控*RPS2* 介导的抗病途径, 故而nat-siRNAATGB2 通过抑制*PPRL*的表达来增强植株的抗病性<sup>[27,31,41,42]</sup>。该

小RNA的产生需要DCL1、HYL1、HEN1、RDR6、SGS3、RNA pol 的参与<sup>[42]</sup>。

Jin等<sup>[26]</sup>在拟南芥中发现一类新型的受细菌或特殊生长条件诱导产生的 30~40 个核苷酸长的lsiRNAs(long siRNAs), 参与植物的ETI反应。丁香假单胞菌无毒因子*avrRpt2* 诱导产生AtlsiRNA-1, 它来源于SRRLK/AtRAP天然反义转录对, 在XRN4 的参与下调节靶标mRNA脱帽反应并使其从 5'-3'降解, 抑制*AtRAP*基因的表达(RAP负调控抗病反应)<sup>[26]</sup>。丁香假单胞菌侵染拟南芥后同时诱导产生了AtlsiRNA-2、AtlsiRNA-3 和AtlsiRNA-4, 但它们的含量变化不大<sup>[26]</sup>。

近年来的研究表明, 植物与真菌互作也能产生小RNA。Xin等<sup>[51]</sup>研究发现, 小麦被白粉病菌侵染后产生了大量非编码蛋白的小RNA, 其中包括

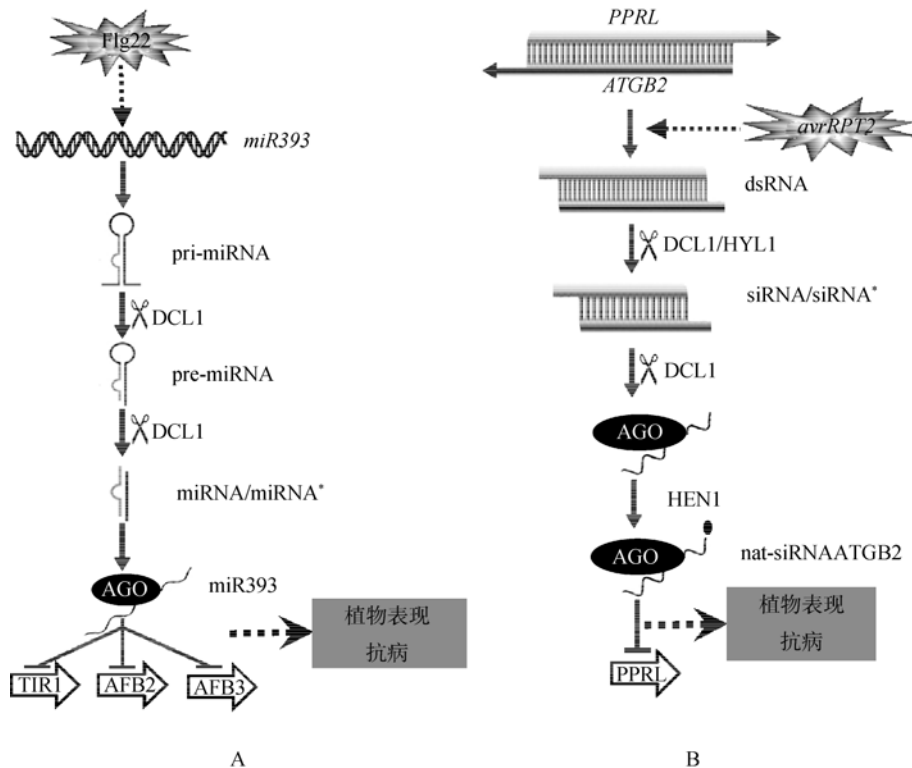


图 1 病原菌诱导植物产生小 RNA

A: 细菌的鞭毛蛋白诱导*miR393* 基因的表达, 产生初级miRNA, 初级miRNA在DCL1 的参与下先后生成前体miRNA和miRNA/miRNA\*复合体, AGO蛋白与该复合体结合并剪切生成单链成熟的miR393, 它负调控生长素受体基因*TIR1*、*AFB2* 和*AFB3* 的表达, 进而增强植物体的抗病反应<sup>[40]</sup>。B: 在丁香假单胞杆菌无毒因子*avrRpt2* 的诱导下, *ATGB2* 和*PPRL*基因的重叠区转录本在DCL1 及其分子

伴侣HYL1 等的作用下产生双链siRNA/siRNA\*的复合体,随后在DCL1 及AGO蛋白等的作用下产生nat-siRNAATGB2,通过抑制PPRL 基因的表达增强宿主植株的抗性<sup>[42]</sup>。

miRNAs、siRNAs、7S RNA变体和snoRNA。轮枝孢属真菌侵染后,拟南芥sgs2(suppressor of gene silencing 2)突变体的感病程度比野生型严重,研究证实AGO7、DCL4、RDR2、HEN1 和HST都参与拟南芥抵抗轮枝孢属真菌的侵染<sup>[52]</sup>。柱锈菌属真菌侵染火炬松后会诱导产生梭形锈病,在火炬松中检测到有多种特异小RNA的上调表达<sup>[31]</sup>。根瘤菌侵染豆科植物后,miR160、miR393、miR164 和miR168 的含量发生变化<sup>[31]</sup>。苜蓿的根被根瘤菌侵染后会诱导产生miR169,它通过抑制MtHAP2-1 转录因子的表达阻碍结节分生区的分化<sup>[53]</sup>,但根瘤菌与寄主间的此类互作是否还参与抗病过程还需进一步探究。

拟南芥哥伦比亚生态型中的RPP4 基因编码类白细胞介素受体-核苷酸结合位点-富含亮氨酸重复(Toll/Interleukin-1 receptor like-nucleotide binding site-leucine-rich repeat, TIR-NBS-LRR)类抗病基因,在植物中检测到的来源于RPP4 基因的siRNAs能调控抗病基因的表达<sup>[48]</sup>。在茄科植物中,发现了许多微型反向重复转座子元件(Miniature inverted-repeat transposable elements, MITEs)相关的小RNA, MITEs插入烟草的N基因,成为外显子的一部分,调控抗病反应<sup>[54]</sup>。

### 3.2 小RNA 参与抗病毒反应

植物抵御细菌和真菌侵染的小RNA通常是内源的,抗病毒的小RNA既有内源的也有外源的。Hamilton等<sup>[55]</sup>首次发现来源于马铃薯X病毒的小RNA。Li等<sup>[56]</sup>发现vsiRNA能抑制病毒的生长。Hassani-Mehraban等<sup>[57]</sup>用番茄黄环斑病毒侵染含该病毒部分N基因序列的转基因烟草后,烟草表现出抗病毒的表型。Domier等<sup>[58]</sup>发现小RNA与大豆花叶病毒在大豆种子间的传递与种皮斑驳有关。Amin等<sup>[59]</sup>用菜豆金花叶病毒属病毒侵染烟草后,部分miRNAs含量降低,这可能与植株广谱抗性的提高相关。Shimizu等<sup>[60]</sup>将水稻条纹叶枯病毒的基因编码序列转入水稻中,再用水稻条纹叶枯病毒侵染,这时水稻表现抗病毒特性。

病毒侵染植物后会诱导vsiRNAs的产生<sup>[61]</sup>,植物体内的DCL酶PRR(Pattern recognition receptors)能

特异性识别并加工病毒的dsRNA中间体<sup>[18]</sup>,形成初级siRNAs,随后在RDRs<sup>[62]</sup>及DCLs的参与下产生大量次级siRNAs<sup>[18]</sup>(次级小RNA具有转移性<sup>[62]</sup>),形成RISC抑制抗病毒相关目的基因的转录(甲基化等)、翻译<sup>[63]</sup>或剪切靶标mRNA<sup>[64]</sup>,参与植物的先天性免疫反应。病毒的dsRNA可以来自于病毒ssRNA的折叠或来自病毒RNA的复制中间体,也可由RDRs复制而来<sup>[15]</sup>。许多病毒的dsRNA是由DCL4<sup>[18]</sup>或DCL2<sup>[65]</sup>指导剪切的。如黄瓜花叶病毒侵染拟南芥后,在RDR1、RDR6、DCL4 和DCL2 的参与下合成vsiRNA<sup>[66]</sup>,烟草脆裂病毒侵染植物后,在RDR1、RDR2、RDR6、DCL4 和DCL2 的参与下生成vsiRNA<sup>[67]</sup>。但也有一些vsiRNA的合成没有RDRs的参与,也不形成完全互补配对的dsRNA,如来自于兰花环指病毒的siRNA<sup>[68]</sup>。通常情况下,AGO1 参与植物抗病毒基础免疫反应,AGO2 参与植物抗病毒第二道免疫反应<sup>[17]</sup>。

寄主植物产生的小RNA 5'端有一个磷酸基团,3'端有一个羟基。相比较而言,vsiRNAs 5'端有一个磷酸基团,3'端有些有羟基有些没有<sup>[18]</sup>。研究显示,3'端没被甲基化的vsiRNAs可能不与AGO蛋白相结合。

vsiRNAs既可以在转录水平上的基因沉默(Transcriptional gene silencing, TGS),又可以在转录后的基因沉默(Posttranscriptional gene silencing, PTGS)中发挥作用,也可以两种沉默机制共存。将番茄卷叶病毒的启动子连接报告基因导入烟草植株中,之后用番茄卷叶病毒侵染转基因烟草,此报告基因在甲基化(TGS)水平上被沉默<sup>[69]</sup>。当花椰菜花叶病毒侵染拟南芥后,病毒产生的vsiRNA通过PTGS途径下调寄主基因Atlg76950 的表达量<sup>[70]</sup>。胡椒金花叶病毒侵染胡椒后,通过TGS途径对病毒复制中间体甲基化来抑制病毒的生长,PTGS途径作用于病毒编码区降解来源于病毒的转录本<sup>[50]</sup>。十字花科植物受芜菁花叶病毒侵染后能诱导产生miR1885 和miR158,它们能酶切TIR-NBS-LRR类抗病基因<sup>[44]</sup>。

在植物与病毒的竞争生长过程中,病毒会合成RNA沉默抑制子(Viral suppressors of RNA silencing, VSR),抑制植物抗病毒的小RNA沉默途径。病毒基因组可以编码多种VSRs,通过不同途径抑制植物抗

病毒沉默信号<sup>[46]</sup>。如黄瓜花叶病毒的2b蛋白阻止沉默信号在细胞间的移动<sup>[71]</sup>。芜菁皱缩病毒编码的P38衣壳蛋白通过抑制DCL4的功能达到阻断沉默信号的作用<sup>[72]</sup>。花椰菜花叶病毒的P6蛋白能抑制核蛋白DRB4的活性,从而干扰21nt-siRNAs的生成<sup>[46]</sup>。马铃薯卷叶病毒合成的P0蛋白能降解AGO1,从而干扰RISC的功能。番茄黄曲叶病毒合成的V2能与SGS3结合,抑制RDR6的功能,从而抑制了来源于寄主的dsRNA的产生<sup>[73]</sup>。烟草蚀纹病毒合成的沉默抑制子能抑制HEN1的功能,从而抑制vsiRNA的甲基化<sup>[74]</sup>。与此同时,植物通过R蛋白的不断进化抵抗病毒沉默抑制子的作用<sup>[46]</sup>。

## 4 结 语

植物的小RNA研究发展迅速,目前已发现小RNA参与调节植物的发育、激素平衡、花形态建成、繁殖能力以及调节植物的生物与非生物胁迫等方面。目前,在小RNA参与植物免疫反应的研究领域中,植物与病毒互作中的小RNA已经研究的较多,但对于植物与细菌和真菌互作中的小RNA了解的还比较少,小RNA参与植物抗病途径的研究尚处于初级阶段。通过直接克隆、生物信息学等方法挖掘参与抗病途径的小RNA并探索其如何参与抗病信号转导途径无疑将成为今后的研究热点。一些小RNA参与调节多个靶基因,处于多个抗病途径的交叉点,研究这些小RNA具有非常重要的意义。带有毒性基因(*Vir*)或无毒基因(*Avr*)的丁香假单胞杆菌侵染植物后会诱导植物产生小RNA,使感病组织DNA的甲基化程度降低,异染色质区域的浓缩程度降低,这些变化会增加DNA发生重组以及遗传变异的几率,这为植物与病原菌的竞争进化理论提供了理论基础<sup>[41]</sup>。同时,将常规育种及分子标记辅助育种相结合,选育小RNA参与调节的抗病品种具有广阔的应用前景。

## 参考文献(References):

- [1] Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature*, 2004, 431(7006): 356–363. DOI
- [2] Izant JG, Weintraub H. Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis. *Cell*, 1984, 36(4): 1007–1015. DOI
- [3] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 1990, 2(4): 279–289. DOI
- [4] Aliyari R, Ding SW. RNA-based viral immunity initiated by the Dicer family of host immune receptors. *Immunol Rev*, 2009, 227(1): 176–188. DOI
- [5] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281–297. DOI
- [6] Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001, 294(5543): 862–864. DOI
- [7] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75(5): 843–854. DOI
- [8] Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391(6669): 806–811. DOI
- [9] Zamore PD, Haley B. Ribo-gnome: The big world of small RNAs. *Science*, 2005, 309(5740): 1519–1524. DOI
- [10] Meyers BC, Axtell MJ, Bartel B, Bartel DP, Baulcombe D, Bowman JL, Cao XF, Carrington JC, Chen XM, Green PJ, Griffiths-Jones S, Jacobsen SE, Mallory AC, Martienssen RA, Poethig RS, Qi YJ, Vaucheret H, Voinnet O, Watanabe Y, Weigel D, Zhu JK. Criteria for annotation of plant MicroRNAs. *Plant Cell*, 2008, 20(12): 3186–3190. DOI
- [11] Vazquez F. Arabidopsis endogenous small RNAs: highways and byways. *Trends Plant Sci*, 2006, 11(9): 460–468. DOI
- [12] Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 2001, 409(6818): 363–366. DOI
- [13] Ketting RF, Fischer SEJ, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RHA. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*, 2001, 15(20): 2654–2659. DOI
- [14] 谢兆辉. RNA沉默在植物生物逆境反应中的作用. *遗传*, 2010, 32(6): 561–570. DOI
- [15] Llave C. Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends Plant Sci*, 2010, 15(12): 701–707. DOI
- [16] Park W, Li JJ, Song RT, Messing J, Chen XM. Carpel factory, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*, 2002, 12(17): 1484–1495. DOI
- [17] Harvey JJW, Lewsey MG, Patel K, Westwood J, Heimstädt S, Carr JP, Baulcombe DC. An antiviral defense role of AGO<sub>2</sub> in plants. *PLoS One*, 2011, 6(1): e14639. DOI

- [18] Ding SW. RNA-based antiviral immunity. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(9): 632–644. [DOI](#)
- [19] Raja P, Sanville BC, Buchmann RC, Bisaro DM. Viral genome methylation as an epigenetic defense against geminiviruses. *J Virol*, 2008, 82(18): 8997–9007. [DOI](#)
- [20] 赵庆臻, 赵双宜, 夏光敏. 植物RNA沉默机制的研究进展. *遗传学报*, 2005, 32(1): 104–110. [DOI](#)
- [21] Schiebel W, Péliissier T, Riedel L, Thalmeir S, Schiebel R, Kempe D, Lottspeich F, Sanger HL, Wassenegger M. Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. *Plant Cell*, 1998, 10(12): 2087–2101. [DOI](#)
- [22] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 2009, 136(4): 642–655. [DOI](#)
- [23] Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(2): 126–139. [DOI](#)
- [24] Chen XM. Small RNAs and their roles in plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2009, 25: 21–44. [DOI](#)
- [25] 许振华, 谢传晓. 植物microRNA与逆境响应研究进展. *遗传*, 2010, 32(10): 1018–1030. [DOI](#)
- [26] Katiyar-Agarwal S, Gao S, Vivian-Smith A, Jin HL. A novel class of bacteria-induced small RNAs in *Arabidopsis*. *Gene Dev*, 2007, 21(23): 3123–3134. [DOI](#)
- [27] Jin HL. Endogenous small RNAs and antibacterial immunity in plants. *FEBS Lett*, 2008, 582(18): 2679–2684. [DOI](#)
- [28] Rajagopalan R, Vaucheret H, Trejo J, Bartel DP. A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev*, 2006, 20(24): 3407–3425. [DOI](#)
- [29] Carmell MA, Xuan ZY, Zhang MQ, Hannon GJ. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev*, 2002, 16(21): 2733–2742. [DOI](#)
- [30] Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 2000, 101(1): 25–33. [DOI](#)
- [31] Katiyar-Agarwal S, Jin HL. Role of small RNAs in host-microbe interactions. *Annu Rev Phytopathol*, 2010, 48(1): 225–246. [DOI](#)
- [32] 谢兆辉. 天然反义转录物及其调控基因的表达机制. *遗传*, 2010, 32(2): 122–128. [DOI](#)
- [33] Chitwood DH, Timmermans MCP. Small RNAs are on the move. *Nature*, 2010, 467(7314): 415–419. [DOI](#)
- [34] Molnar A, Melnyk CW, Bassett A, Hardcastle TJ, Dunn R, Baulcombe DC. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science*, 2010, 328(5980): 872–875. [DOI](#)
- [35] Dunoyer P, Himber C, Voinnet O. Dicer-like 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nat Genet*, 2005, 37(12): 1356–1360. [DOI](#)
- [36] Flor HH. Current status of the gene-for-gene concept. *Ann Rev Phytopathol*, 1971, 9(1): 275–296. [DOI](#)
- [37] Van der Biezen EA, Jones JDG. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci*, 1998, 23(12): 454–456. [DOI](#)
- [38] Keen NT. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu Rev Genet*, 1990, 24(1): 447–463. [DOI](#)
- [39] Zhou JM, Chai JJ. Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses. *Curr Opin Microbiol*, 2008, 11(2): 179–185. [DOI](#)
- [40] Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JDG. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, 2006, 312(5772): 436–439. [DOI](#)
- [41] Padmanabhan C, Zhang XM, Jin HL. Host small RNAs are big contributors to plant innate immunity. *Curr Opin Plant Biol*, 2009, 12(4): 465–472. [DOI](#)
- [42] Katiyar-Agarwal S, Morgan R, Dahlbeck D, Borsani O, Villegas A Jr, Zhu JK, Staskawicz BJ, Jin HL. A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(47): 18002–18007. [DOI](#)
- [43] Jagadeeswaran G, Saini A, Sunkar R. Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in *Arabidopsis*. *Planta*, 2009, 229(4): 1009–1014. [DOI](#)
- [44] He XF, Fang YY, Feng L, Guo HS. Characterization of conserved and novel microRNAs and their targets, including a TuMV-induced TIR-NBS-LRR class R gene-derived novel miRNA in Brassica. *FEBS Lett*, 2008, 582(16): 2445–2452. [DOI](#)
- [45] Fahlgren N, Howell MD, Kasschau KD, Chapman EJ, Sullivan CM, Cumbie JS, Givan SA, Law TF, Grant SR, Dangl JL, Carrington JC. High-throughput sequencing of *Arabidopsis* microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PLoS One*, 2007, 2(2): e219. [DOI](#)
- [46] Ruiz-Ferrer V, Voinnet O. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu Rev Plant Biol*, 2009, 60(1): 485–510. [DOI](#)
- [47] Allen E, Xie ZX, Gustafson AM, Carrington JC. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 2005, 121(2): 207–221. [DOI](#)
- [48] Yi HK, Richards EJ. A cluster of disease resistance genes in *Arabidopsis* is coordinately regulated by transcriptional activation and RNA silencing. *Plant Cell*, 2007, 19(9): 2007–2018. [DOI](#)



- 2929–2939. [DOI](#)
- [49] Dunoyer P, Himber C, Voinnet O. Induction, suppression and requirement of RNA silencing pathways in virulent *Agrobacterium tumefaciens* infections. *Nat Genet*, 2006, 38(2): 258–263. [DOI](#)
- [50] Rodríguez-Negrete EA, Carrillo-Tripp J, Rivera-Bustamante RF. RNA Silencing against geminivirus: complementary action of posttranscriptional gene silencing and transcriptional gene silencing in host recovery. *J Virol*, 2009, 83(3): 1332–1340. [DOI](#)
- [51] Xin MM, Wang Y, Yao YY, Song N, Hu ZR, Qin DD, Xie CJ, Peng HR, Ni ZF, Sun QX. Identification and characterization of wheat long non-protein coding RNAs responsive to powdery mildew infection and heat stress by using microarray analysis and SBS sequencing. *BMC Plant Biol*, 2011, 11(1): 61. [DOI](#)
- [52] Ellendorff U, Fradin EF, de Jonge R, Thomma BPHJ. RNA silencing is required for *Arabidopsis* defence against *Verticillium* wilt disease. *J Exp Bot*, 2009, 60(2): 591–602. [DOI](#)
- [53] Voinnet O. Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: a touch of robustness and versatility. *Curr Opin Plant Biol*, 2008, 11(4): 464–470. [DOI](#)
- [54] Kuang H, Padmanabhan C, Li F, Kamei A, Bhaskar PB, Ouyang S, Jiang JM, Buell CR, Baker B. Identification of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) and biogenesis of their siRNAs in the Solanaceae: new functional implications for MITes. *Genome Res*, 2009, 19(1): 42–56. [DOI](#)
- [55] Hamilton AJ, Baulcombe DC. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 1999, 286(5441): 950–952. [DOI](#)
- [56] Li HW, Li WX, Ding SW. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science*, 2002, 296(5571): 1319–1321. [DOI](#)
- [57] Hassani-Mehraban A, Brenkman AB, van den Broek NJF, Goldbach R, Kormelink R. RNAi-mediated transgenic tospovirus resistance broken by intraspecies silencing suppressor protein complementation. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2009, 22(10): 1250–1257. [DOI](#)
- [58] Domier LL, Hobbs HA, McCoppin NK, Bowen CR, Steinlage TA, Chang S, Wang Y, Hartman GL. Multiple loci condition seed transmission of *soybean mosaic virus* (SMV) and SMV-induced seed coat mottling in soybean. *Phytopathol*, 2011, 101(6): 750–756. [DOI](#)
- [59] Amin I, Patil BL, Briddon RW, Mansoor S, Fauquet CM. A common set of developmental miRNAs are upregulated in *Nicotiana benthamiana* by diverse begomoviruses. *Virology*, 2011, 8(1): 143. [DOI](#)
- [60] Shimizu T, Nakazono-Nagaoka E, Uehara-Ichiki T, Satsaya T, Omura T. Targeting specific genes for RNA interference is crucial to the development of strong resistance to *Rice stripe virus*. *Plant Biotechnol J*, 2011, 9(4): 503–512. [DOI](#)
- [61] Xie ZX, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, Zilberman D, Jacobsen SE, Carrington JC. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol*, 2004, 2(5): e104. [DOI](#)
- [62] Curaba J, Chen XM. Biochemical activities of *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase 6. *J Biol Chem*, 2008, 283(6): 3059–3066. [DOI](#)
- [63] Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, 2008, 320(5880): 1185–1190. [DOI](#)
- [64] Llave C, Xie ZX, Kasschau KD, Carrington JC. Cleavage of *Scarecrow-like* mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science*, 2002, 297(5589): 2053–2056. [DOI](#)
- [65] Gasconelli V, Mallory AC, Bartel DP, Vaucheret H. Partially redundant functions of *Arabidopsis* Dicer-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. *Curr Biol*, 2005, 15(16): 1494–1500. [DOI](#)
- [66] Wang XB, Wu QF, Ito T, Cillo F, Li WX, Chen XM, Yu JL, Ding SW. RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(1): 484–489. [DOI](#)
- [67] Donaire L, Barajas D, Martínez-García B, Martínez-Priego L, Pagán I, Llave C. Structural and genetic requirements for the biogenesis of *tobacco rattle virus*-derived small interfering RNAs. *J Virol*, 2008, 82(11): 5167–5177. [DOI](#)
- [68] Szittyá G, Moxon S, Pantaleo V, Toth G, Pilcher RLR, Moulton V, Burgyn J, Dalmay T. Structural and functional analysis of viral siRNAs. *PLoS Pathog*, 2010, 6(4): e1000838. [DOI](#)
- [69] Seemanpillai M, Dry I, Randles J, Rezaian A. Transcriptional silencing of geminiviral promoter-driven transgenes following homologous virus infection. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2003, 16(5): 429–438. [DOI](#)
- [70] Moissiard G, Voinnet O. RNA silencing of host transcripts by cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four *Arabidopsis* Dicer-like proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(51): 19593–19598. [DOI](#)
- [71] Guo HS, Ding SW. A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO J*, 2002, 21(3): 398–407. [DOI](#)

- [72] Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao JS, Kasschau KD, Carrington JC, Voinnet O. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science*, 2006, 313(5783): 68–71. [DOI](#)
- [73] Glick E, Zrachya A, Levy Y, Mett A, Gidoni D, Belausov E, Citovsky V, Gafni Y. Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(1): 157–161. [DOI](#)
- [74] Lózsá R, Csorba T, Lakatos L, Burgyán J. Inhibition of 3' modification of small RNAs in virus-infected plants require spatial and temporal co-expression of small RNAs and viral silencing-suppressor proteins. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(12): 4099–4107. [DOI](#)