

植物病毒诱导的基因沉默效应的分子机制

赵爽, 王琦, 李艳红*

首都师范大学生命科学院, 北京 100037

Molecular Mechanism of Virus Induced Gene Silencing in Plants

ZHAO Shuang, WANG Qi, LI Yan-Hong*

College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100037, China

摘要: 主要从病毒诱导的基因沉默体系中植物与病毒的相互作用、VIGS 涉及的信号分子和移动方式以及靶基因的沉默和病毒载体的复制关系介绍和分析植物病毒诱导的基因沉默效应的分子机制, 并进一步分析此种体系在植物基因功能研究中应用的研究进展。

关键词: 植物病毒; 病毒诱导的基因沉默; 沉默信号; 病毒载体的变化

RNA 沉默现象最早是在植物中发现的。Fire 等(1998)首次提出在秀丽新小杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)中双链 RNA (double-strand RNA, dsRNA) 能高效特异地阻断相应基因的表达, 并将这一现象称为 RNA 干涉(RNA interference, RNAi)。在随后的几年内, 人们相继发现这种现象广泛存在于植物、真菌、线虫、昆虫等几乎所有的真核生物中, 是一种非常保守的机制并且具有广阔的应用前景。为此 2006 年的诺贝尔生理学或医学奖颁发给了这一机制的发现者 Andrew Z. Fire 和 Craig C. Mello。

众所周知, RNA 沉默现象的基本机制是在外源或病毒的基因侵入细胞后, 各种转录的异常 RNA 或病毒的复制型双链 RNA 作为沉默的引发因子, 在细胞内被类似 RNase III 家族的特异性核酸内切酶 Dicer 类似物(DCL)切割成 21~25 nt 的 siRNA (small interfering RNA); siRNA 被解旋酶解成单链后, 再与 RNA 诱导的沉默复合物(RNA induced silencing complex, RISC)结合, 其反义链互补结合到靶向的 mRNA 上与之相匹配的特异性序列, RISC 中的核酸酶特异性地降解与 siRNA 同源的信使 RNA (messenger RNA, mRNA), 导致靶基因表达水平的下降。另外细胞内 siRNA 扩增的机制, 即反义的 siRNA 作为引物, 以 mRNA 为模板在 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerases)的作用下形成次级的 dsRNA, 再进而形成新的 siRNA, 可起到放大沉默信号的作用, 导致短时间内迅速并有效地降解靶基因 mRNA,

达到基因沉默的作用。近年来随着人们对植物和病毒相互作用机制的研究, 病毒诱导的基因沉默(virus induced gene silencing, VIGS)即由携带基因片段的病毒载体感染植物可引起相应的寄主基因沉默的现象逐步成为人们用来研究植物基因功能的重要反向遗传学的手段。

尽管如此, 目前人们对该机制中不同有机体涉及的具体成分及具体作用效果并没有彻底的了解, 大量的探讨工作还待继续。下面我们针对植物中最常用的病毒诱导的基因沉默体系, 从植物与病毒的相互作用及病毒诱导的基因沉默(VIGS)效应综合介绍这一领域目前的研究概况。

1 植物和 RNA 病毒的相互作用

植物病毒有很多种, 其中 RNA 病毒占 90% 以上。植物病毒侵入细胞后一般靠细胞间的传播进行近距离的转移, 进入韧皮部后再进行远距离的运输从而实现系统性的侵染。最终导致那些无抗性的植株产生典型的病毒侵染症状, 如花叶、卷叶或叶片严重畸形等现象。但也有的宿主出现坏死斑抑制病毒的系统传播, 或出现病毒症状的恢复甚至能完全抵抗病毒症状的出现, 也就是说植物体内存在抑制病毒的系统传播的抗病毒的机制。随着人们对基因沉默现象的认识, 很多学者认为植物体可通过系统性沉默阻断病毒的进一步侵

收稿 2007-01-08 修定 2007-03-19
资助 北京市科技新星计划(H013610020112)。

* 通讯作者(E-mail: liyh@cnu.edu.cn; Tel: 010-68901692)。

染,即植物RNA病毒侵入细胞后,通过在宿主细胞内复制形成双链RNA的中间体,作为诱发基因沉默的靶子,然后通过切割形成siRNA,再进一步在RISC复合物的作用下沉默其他病毒RNA分子或亲缘关系较近的病毒分子,导致病毒在宿主内的积累量受到抑制,从而达到抗病毒的效果。

在植物和病毒的相互作用过程中,植物病毒通过不同方式的序列变化(如:突变、重组、自然选择、基因漂流或迁移等)也演化出了应对这种宿主反应的反防御机制。对病毒基因组的序列分析表明,容易变化的区域大多与病毒的反防御功能有关。如黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)中编码2b蛋白的基因序列是在进化的过程中出现的,后来经证实是CMV中重要的抑制蛋白;Potyviruses的编码HC-Pro(helper component-proteinase)的序列等也都是非常容易变化的序列,可通过抑制RNA沉默来对抗植物的防御反应。但不同的抑制蛋白在不同的植物与病毒的相互作用体系中作用效果可能有所不同。Brigneti等(1998)发现CMV 2b蛋白能完全抑制新生的组织中信号介导传递的沉默,但不能恢复已经沉默的植物组织。Potyviruses的抑制蛋白HC-Pro能恢复所有组织中的沉默现象,使已经发生沉默的GFP重新表达,即发生“恢复现象”。马铃薯X(potato virus X, PVX)病毒编码的25 kDa的蛋白通过农杆菌侵染方法也已证明具有抑制系统性沉默的作用(Brigneti等1998)。

进一步的实验证明,在不同的病毒系统中,抑制蛋白的作用时间和方式不同。CMV编码的2b蛋白作用于沉默的起始阶段,可在新生的尚未有沉默效应的组织中起作用,通过直接干扰DNA甲基化和可移动沉默信号的产生及其活性而抑制沉默。马铃薯Y(potato virus Y, PVY)病毒编码的HC-Pro可能作用于移动信号或甲基化信号环节的下游,通过干扰dsRNA前体形成siRNA或降低siRNA的稳定性,以及抑制microRNA(miRNA)的积累来抑制siRNA或miRNA介导的沉默现象,它既可以阻断局部的RNA沉默,也可阻断系统性沉默。番茄丛矮病毒(*Tomato bushy stunt virus*, TBSV)编码的P19蛋白是目前研究最多的一类。P19蛋白具有双链小RNA结合活性,通过形成P19-siRNA复

合物减少细胞内游离的siRNA,并使结合态的siRNA不能结合RISC,从而减少siRNA与RISC的结合达到抑制基因沉默的目的(Lakatos等2004);而Aureusvirus编码的P14蛋白则通过非特异地抑制长链dsRNA或siRNA的形成来阻止病毒诱导的或转基因导致的基因沉默(Merai等2005)。在PVX系统中P25及芜菁黄花叶病毒(*Turnip yellow mosaic virus*, TYMV)编码的P69蛋白则通过影响依赖于RNA的RNA聚合酶6(RNA-dependent RNA polymerases 6, RDR6)的次级dsRNA和次级VIGS的形成,影响RISC的组装和活性阻止沉默现象扩散到上部组织(Klahre等2002; Gyergy等2002; Silhavy等2002; Morel等2002; Malloy等2002)。最近Merai等(2006)根据很多病毒的抑制蛋白的作用方式推测结合dsRNA可能是植物RNA病毒通用的一种抑制基因沉默的策略,而Lakatos等(2006)认为对有些病毒抑制蛋白来讲则通过与小RNA分子的结合达到抑制基因沉默的目的。

检测病毒侵染的植物中小分子RNA的大小时发现,不同的病毒与宿主作用过程中产生大小不同的siRNA。许多病毒主要诱导产生21 nt大小的siRNA,另有一些病毒产生21 nt和24 nt的siRNA的混合物。还有一些病毒主要触发产生24 nt或22 nt的病毒siRNA。Deteris等(2006)认为,产生这种差别的原因与DCL的丰富度及病毒抑制蛋白作用于DCL指导的沉默方式有关。目前在植物中发现至少存在4种DCL,拟南芥中一种DCL用于产生miRNA,一种产生siRNA介导染色质水平的变化,而剩下的2种与植物的防御反应有关(Deteris等2006)。烟草脆裂病毒(*Tobacco rattle virus*, TRV)侵染拟南芥产生21 nt和24 nt的siRNA,但当芜菁萎缩病毒(*Turnip crinkle virus*, TCV)侵染时则仅产生22 nt的siRNA。进一步研究发现TCV 22 nt的siRNAs主要由DCL2指导产生,而TRV的21 nt和24 nt的siRNA分别由DCL4和DCL3指导形成,但仅仅21 nt siRNA对病毒沉默起作用。另外发现,如果病毒抑制蛋白不封闭DCL4的活性,TCV的RNA也能受由DCL4指导产生的siRNA靶向结合;对于TRV也是如此,如果DCL4活性丧失,TRV可以被DCL2指导产生的22 nt的

siRNAs 靶向结合形成 RISC, 最终使病毒基因沉默。因此 Waterhouse 和 Fusaro (2006) 认为病毒面临植物小 RNA 的双重防御, DCL4 是抗病毒防御的第一道防线, DCL4 受病毒抑制蛋白结合失活时 DCL2 指导的活性即开始起作用。

当然也有人认为病毒可通过另外的方式来抑制基因沉默, 如红花翘摇花叶病毒(*Red clover necrotic mosaic virus*, RCNMV) 可通过病毒 RNA 的复制来抑制基因沉默现象(Taketa 等 2005)。另外, miRNA 指导的加工过程可能也在植物和病毒的相互作用过程中起作用, 它可能对植物的防御反应和过量的病毒增殖均有干涉, 使二者的相互作用达到平衡, 而不只是单纯的消灭病毒。

由此可见, 不同的植物和病毒在不同的条件下, 其作用方式是非常复杂的, 二者相互斗争, 协同进化, 发展成为非常重要的防御和反防御的机制。

2 病毒诱导的基因沉默过程中可能的信号分子及其移动方式

植物 RNA 沉默的一个最显著的特征就是沉默状态(信号分子)能够通过植物体进行系统性扩散, 即可能分别通过胞间连丝(plasmodesmata)和韧皮部(phloem)转运系统进行细胞间转移和整个植株的长距离运输。目前越来越多的研究者开始关注这些沉默信号分子以及它们的移动规律。很多证据表明, 可移动的沉默信号的运输类似于病毒在宿主内的移动方式。很多病毒沉默抑制子对于病毒的长距离传播或短距离转移是必须的(Voinnet 等 2000; Ding 等 2007), 表明信号分子是宿主抗病毒反应的重要的组分。下面对植物病毒诱导的基因沉默过程中可能涉及的信号分子及移动规律作简要分析。

由于系统性的沉默是核酸序列特异性的, 因此目前多数学者认为干涉过程中产生的 siRNA 即为可移动的信号分子, siRNA 能够直接启动 RNA 沉默, 并可诱导远离沉默起始位点的叶片发生系统性基因沉默(Klahre 等 2002)。原因是它们的量丰富, 足够诱导体内产生 RNA 沉默, 另外, siRNA 长度适中, 不仅足以代表序列特异性, 较小的分子量又能够方便地通过胞间连丝运输, 且始终与 RNA 沉默密切相关。Bayne (2005) 等认为, 植物

抵抗 PVX 机制就是通过 RNA 干涉实现的, 干涉产生的病毒基因组的 siRNA 能够在被侵染的植物细胞间扩散和韧皮部中转移并可在 RDR6 的帮助下扩增, 引起 RNA 沉默, 从而抑制病毒的传播。Hamilton 等(2002) 将真核生物的基因组防御体系中涉及的 siRNA 分为 2 类, 分别为 21~22 nt 和 24~26 nt, 后者对 mRNA 的降解不是必须的, 但与系统性的沉默和同源 DNA 的甲基化密切相关, 而前者和 mRNA 的降解相关, 但与系统性沉默信号或甲基化无关。Himber 等(2003) 证明, 细胞与细胞之间短距离沉默信号的传播, 可由一个起始细胞传至周围 10~15 个细胞, 信号分子为起始细胞的 21 nt 的 siRNA, 在受体细胞中没有扩增反应产生的与其同源的转录物。长距离传播则需要次级 siRNA 的合成, 其大小也是 21 nt。推测植物中沉默效应信号分子 siRNA 的传播可分为短距离和长距离 2 种, 短距离通过胞间连丝传播 21 nt 的 siRNA, 而长距离则是通过维管束传播 25 nt 的 siRNA。系统性沉默信号分子通过韧皮部进行长距离运输, 在细胞与细胞之间通过胞间连丝进行运输, 植物中沉默信号的传输方向是双向的, 向上和向下传输可同时进行, 但向上的传输更有效(Nancy 2002; Sizolwenkosi 等 2002; Klahre 等 2002)。

另外, 异常的 RNA 也可能作为沉默信号介导系统性沉默。dsRNA 在 RNA 沉默过程中也起至关重要的作用, 有的病毒抑制子就是通过对 dsRNA 的抑制或利用与 dsRNA 相结合的方式而抑制基因沉默发生的(Merai 等 2006), 所以 dsRNA 也可能作为一种沉默信号在系统性沉默中起作用, 但目前对此还没有明确的定论。

Yoo 等(2004) 采用异种嫁接实验的方法, 通过韧皮部中小 RNA 分子的分析, 发现在黄瓜黄化病毒(*Cucumber yellows virus*, CuYV) 的 CP (coat protein) 被沉默的转基因南瓜(*Cucurbita pepo*) 植株中, CP 的 siRNA 也能在韧皮部中长距离的运输, 并能启动异质嫁接的接穗中 CP 基因沉默。他们从沉默 CuYV CP 的南瓜植物韧皮部组织中分离到一种 siRNA 结合蛋白(*Cucurbit maxima* phloem small RNA binding protein 1, CmPSRP1), 发现它能够通过特异地结合 25 nt 的单链 siRNA 并介导沉默信号在

细胞间的转运。植物体内沉默信号的转移是一个复杂的过程,除了沉默信号本身,可能还涉及一些相关蛋白或其他分子的参与。它们可能通过特异性或非特异性的方式来协助基因沉默信号分子的移动。如在南瓜中存在的一种韧皮蛋白(16-kDa *Cucurbit maxima* phloem protein, CmPp16)可以作为分子伴侣加强内源 mRNA 在韧皮部中的运输功能,从而实现沉默信号在韧皮部中的长距离运输,它主要在伴胞和筛管间以非特异性方式运输 RNA (Xoconostle-Cazares 等 1999)。

许多研究表明,在线虫、真菌以及植物细胞中,沉默信号的放大机制是依赖于宿主的 RDRP 或 RDR 实现的。这种沉默信号的放大机制是一种类似于 PCR 反应的过程(Lipardi 等 2001)。病毒诱导的基因沉默可在植物体内产生来自病毒的 siRNA,导致病毒基因组及同源的宿主 RNA 的降解。病毒 dsRNA 迅速被 Dicer 切割,初级 siRNA 逐渐积累,这一过程称为初级 VIGS (Voinnet 2005)。初级 VIGS 必须经过放大系统才能有效的抗病毒。有研究表明,少量的 dsRNA 就足以引发高效的 RNAi 的关键在于植物细胞内 RDRP 的参与并影响 RNA 沉默过程的许多环节(Ahlquist 2002)。Qu 等(2005)发现下调 RDR6 表达的烟草对马铃薯 X 病毒组(*Potexvirus*)、香石竹斑驳病毒组(*Carmovirus*)和烟草花叶病毒组(*Tobamovirus*)等属病毒均更加敏感,表明烟草的 RDR6 也参与了抗病毒的 RNA 沉默的效应,而且随温度升高抗病毒的效应加强;Schwach 等(2005)认为 RDR6 对病毒的复制和在宿主细胞中的移动没有任何影响,并且与 PVX 病毒侵染过程中病毒 siRNA 的形成也没有明显的关系,所以推测 RDR6 不产生或参与移动初级沉默信号,而是以新合成的沉默信号 siRNA 作为引物,以与 siRNA 互补的靶 mRNA 作为模板,合成新的 dsRNA 前体从而进一步产生次级 siRNA 并介导 RNA 沉默,因此它可以作为一种防御机制去减缓病毒向生长点和新生叶片中系统扩散的速度。这与 Lipardi 等(2001)在果蝇中的研究结果相似。如果生物体内的 siRNA 没有被 RDRP 扩增,就会马上降解,只能产生一次性的 RNA 沉默。但基于 RDR6 的 VIGS 信号扩增机制很复杂,它在不同的病毒与宿主的相互作用中表现不同,

如 RDR6 被干涉的植株对 PVX、PVY 和结合有 Y 卫星序列的 CMV 病毒敏感,而对 TMV、TRV、TCV 或单独的 CMV 不敏感(Schwach 等 2005)。另外有人发现,降低 RDR1 的水平也能增强烟草和拟南芥对 TMV 和 PVX 的敏感性(Yu 等 2003)。因此植物的 RDRP 基因有可能是一个复杂的家族,在不同的宿主中包含不同的基因成员,在不同的宿主与病毒相互作用体系中,不同成员所起的作用也不同。由此可见,沉默信号的扩增系统也是一个复杂的机制,对决定植物防御和病毒反防御的结果起重要作用。

另外 miRNA 也是最近几年来人们发现的另一种重要的小分子 RNA,它在生物体内源产生,长度大约只有 22 个核苷酸大小,存在于各种不同生物中,在控制基因表达、调控细胞周期和个体发育中都发挥作用(Simón-Mateo 和 Garcia 2006)。miRNA 可通过类似于 siRNA 的途径在转录水平上特异性降解与其同源的靶 RNA 或通过靶 mRNA 的 3'-UTR 区通过不完全配对结合来抑制 mRNA 的翻译,从而影响蛋白表达水平。miRNA 指导的加工过程也可能通过干涉植物病毒的侵染来加强植物的防御反应,而病毒也可通过病毒抑制子或基因序列的变化来逃避 miRNA 的调控。因此,miRNA 可能也是病毒诱导的基因沉默过程中的信号分子。

3 病毒与靶基因沉默的关系

随着对植物抗病毒机制的了解,越来越多的病毒被改造成为载体用于研究基因的表达。如 TMV、PVX、TRV 等病毒载体已相继应用于基因沉默的研究,目前人们已用这些病毒载体上插入特定的基因片段侵染植物的方法研究了多种基因的功能。由于此法具有独特的优势,目前其使用范围已从双子叶植物逐渐发展到单子叶植物(Burch-Smith 等 2006; Ding 等 2007),从八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase, PDS)标记基因发展到特定的目标基因(Travella 等 2006; 俞竹青等 2006),由奢侈基因到保守基因,发生沉默的器官不仅有营养器官而且还包括花和果实等生殖器官(Ribarits 等 2006),并取得了较大的进展。

在不同的 VIGS 系统中,病毒侵染宿主后会出现病毒积累的变化。据报道,在 VIGS 介导的沉默系统中病毒诱导的内源基因沉默与病毒载体的

变化规律因采用的载体和插入序列不同而异。1998年 Ruiz 等发现, PVX 介导的 GFP 报告基因的沉默会导致快速、明显且长期的对病毒载体的抑制, 但是在介导 *GUS*、*NPT* 或 *PG* 转基因的沉默中只是在靶基因受预先转录后沉默的植株中产生对病毒载体的抑制现象; 而 PVX 介导的 *PDS* 和 *rbcS* 基因的沉默在起始阶段与诱导的病毒载体无关, 但最终沉默的表型也可得到恢复, 从而反映病毒载体可通过 PTGS 而受到抑制 (Ratcliff 等 2001)。但靶基因 RNA 沉默效率是否与病毒积累量相关呢? Dorith 等 (2006) 用 TRV 载体沉默内源基因 *PDS*, 发现番茄中的 CP RNA 丰度与内源基因的丰度呈反相关, 病毒表达量越高, 目的基因表达量越低, 即 RNA 沉默效率越高。反之, 在病毒少量积累或检测不到病毒的区域其靶基因 *PDS* 的表达下降不明显。因此, 他们认为 TRV 在植物组织或邻近的组织中的复制对成功进行靶基因沉默是必须的; 但同样的体系在烟草 (*N. benthamiana*) 中却得到不同的结果, 即烟草中病毒的复制和靶基因的沉默效率之间没有相关性。他们认为有 2 种可能, 一是病毒复制很快, 植物可通过不依赖于病毒的信号传递途径快速产生较多的 *PDS* 沉默信号; 另一种可能是烟草中存在诱导沉默的阈值, 一旦诱发沉默的 RNA 分子达到这个阈值时, 启动沉默现象即发生, 过量的 RNA 不起作用。可见 RNA 沉默效率与病毒之间的关系在不同的宿主之间是有差异的。

Hiriart 等 (2003) 在 TMV 介导的编码 Mg^{2+} 整合酶基因 (*ChlH*) 沉默的体系中发现, 靶基因 *ChlH* 的沉默起始于烟草 (*N. benthamiana*) 顶端幼嫩的组织, 在此区域靶基因的转录水平和病毒载体水平均较高。另外, 在此体系中还存在基因沉默表型和恢复表型的交替现象, 这种交替与体内 TMV 载体的水平和靶基因的水平是相关的, 而且二者的变化成正相关, 即沉默现象发生时病毒载体由于 PTGS 受抑制, 靶基因 mRNA 水平也下降, 二者均降低到一定程度时沉默压力减低, 甚至停止; 接着出现二者水平的同步升高, 当高达一定程度时沉默现象又出现。他们认为此现象与 *ChlH* 是一种日周期调控的基因, 靶基因转录水平在每天周期性的波动可能会引起沉默效率呈平行变化, 从

而可能会促使正在复制的病毒逃避植物通过转录后的基因沉默对其的抑制。

在我们进行的 PVX 介导的 γ -tubulin 基因沉默的体系中也发现, 由于使用的插入片断序列和长度不同, 最终出现的表型也有不同之处。在发生沉默的烟草 (*N. tabacum*) 植株中病毒载体的变化与靶基因沉默的效率之间具有相关性, 但规律不尽相同 (未发表资料)。另外, 在重组的病毒载体侵染植株 2 周左右, 就出现靶基因片断从病毒载体上受剔除的现象。这意味着靶基因沉默的起始可能依赖于病毒的复制, 但沉默现象的维持有可能不依赖于病毒的复制, 而是靠早期形成的信号在体内的扩增变化。为什么二者之间有相关性呢, 它们之间的相关变化机制是什么都还不清楚。

此外, Teycheney 和 Tepfer (2001) 在牵牛花 (red star-type *Petunia hybrida* cultivars) 的研究中发现, 病毒侵染会干扰植物内源查尔酮合成酶 A 基因 (*chs-A*) 的转录后基因沉默, 而且 PVY、TEV (*Tobacco etch virus*, 烟草蚀纹病毒) 和 CMV 病毒分别以空间特异的方式干涉 *chs-A* 的 PTGS 导致花瓣白色区域部分产生不同模式的颜色恢复现象。也就是说, 不同的病毒侵染宿主后会产生复杂的空间上的对 PTGS 介导的基因沉默的诱导和干涉之间的相互作用。

同时许多研究还发现 VIGS 诱导的基因沉默导致的植株表型不太稳定, 或是不能产生预期的表型。也就是说人们还没有真正掌握其根本的分子机制, 导致很多体系中 VIGS 的效率偏低。到目前为止, VIGS 的效率还依赖于环境条件的变化, 且不同的病毒和靶基因体系甚至宿主及其不同器官都有可能需要不同的最佳条件。有人认为较高的温度容易使植物展现较强的基因沉默的效应, 在竺科植物环座花斑病毒 (*Cymbidium ringspot virus*, CymRSV) 介导的烟草基因沉默体系中发现, 15 低温条件下植物对病毒比较敏感, 基因沉默导致的表型丧失。进一步分析发现低温下的体内病毒和靶基因中 siRNA 减少, 随着温度升高 siRNA 水平也提高。因此认为低温能抑制 siRNA 的产生, 并导致基因沉默效率下降 (Szittyta 等 2003); 我们用 PVX 介导的 γ -tubulin 基因沉默的研究也发现高温 (28~30) 条件有利于诱发基因沉默的表型。但

也有相反的报道, Fu等(2006)的实验表明, 低温(15℃)和低湿(30%)条件下TRV介导的烟草PDS基因和LeEIN2基因在番茄花和果实中沉默效率会明显加强。

此外, 基因沉默的效率也与接种病毒载体的时期有关。玫瑰4~6叶期接种在其叶片中可观察到沉默现象, 而如果想在花器官中观察到沉默现象则需在10~12叶时接种。TRV诱导拟南芥PDS基因沉默的最佳时期是2~3叶的植株和16 h/8 h光周期条件(Burch-Smith等2006); 我们用PVX接种病毒的试验也发现, 如果苗龄过大, 则不利于沉默的诱导, 以4~5叶时的植株最合适。总之, 目前人们主要在不同病毒载体和靶基因试验体系中发现不同的外界环境对基因沉默的效率有不同的影响, 但其内在的影响因子, 即在什么情况下基因沉默机制开始运转或停止运转都还不清楚。估计可能与不同的条件下植物和病毒相互作用的情况不同有关, 另外也可能与沉默过程中某些关键因子受外界条件如温度等调控有关(Qu等2005)。

总之, VIGS诱导基因沉默的机制非常复杂。它因所使用的病毒载体的类型和宿主, 甚至特定的靶基因片断不同而产生不同的效果。沉默过程中病毒对靶基因沉默效率的影响也因具体的体系不同而有明显差异。我们认为归根结底VIGS导致的基因沉默效应还与病毒载体入侵植物后引发的病毒与植物的相互作用有关, 不同的环境条件、不同的宿主的基因型和不同的病毒组合条件下病毒和宿主的相互作用情况不同, 都有可能产生不同的沉默现象。再加上靶基因片断的插入这一过程又更进一步复杂化, 因此进一步深入了解病毒和宿主的相互作用机制, 从更深的层次上认识沉默过程中的病毒载体与靶基因变化规律对于人们更好地利用VIGS系统进行植物基因功能或功能基因组研究的深入都有意义。

参考文献

俞竹青, 朱骏, 高菊芳, 杨仲南(2006). 水稻P0491E01基因调控花药发育的功能分析. 分子细胞生物学报, 39(5): 467~472
 Ahlquist P (2002). RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. Science, 296: 1270~1273
 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 391:

806~811
 Bayne EH, Rakitina DV, Morozov SY, Baulcombe DC (2005). Cell-to-cell movement of potato potyvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. Plant J, 44: 471~482
 Brigneti G, Voinnet O, Li WX, Ji LH, Ding SW, Baulcombe DC (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. EMBO J, 17: 6739~6746
 Burch-Smith TM, Schiff M, Liu Y, Dinesh-Kumar SP (2006). Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 142(1): 21~7
 Deteris A, Javier GB, Bao JS, Kristin DK, James CC, Voinnet O (2006). Hierarchical action and inhibition of plant dicer-like proteins in antiviral defense. Science, 313: 68~71
 Ding XS, Rao CS, Nelson RS (2007). Analysis of gene function in rice through virus-induced gene silencing. Methods Mol Biol, 354: 145~160
 Dorith RC, Thea ST, Thomas LG, David KW (2006). Methods for effective real-time RT-PCR analysis of virus-induced gene silencing. J Virol Methods, 138: 49~59
 Fu DQ, Zhu BZ, Zhu HL, Zhang HX, Xie YH, Jiang WB, Zhao XD, Luo YB (2006). Enhancement of virus-induced gene silencing in tomato by low temperature and low humidity. Mol Cell, 21: 153~160
 Gyergy S, Attila M, Daniel S, Csaba H, Jozsef B (2002). Short defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus. Plant Cell, 14: 359~372
 Hamilton AJ, Voinnet O, Chappell L, Baulcombe DC (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. EMBO J, 21: 4671~4679
 Himer C, Dunoyer P, Moissiard G, Ritzenthaler C, Voinnet O (2003). Transitivity-dependent and-independent cell-to-cell movement of RNA silencing. EMBO J, 22: 4523~4533
 Hiriart JB, Aro EM, Lehto K (2003). Dynamics of the VIGS-mediated chimeric silencing of the *Nicotiana benthamiana* *ChlH* gene and of the tobacco mosaic virus vector. Mol Plant Micro Interact, 16(2): 99~106
 Klahre U, Crete P, Leuenberger SA, Iglesias VA, Meins FJ (2002). High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. Proc Natl Acad Sci USA, 99: 11981~11986
 Lakatos L, Csorba T, Pantaleo V, Chapman EJ, Carrington JC, Liu YP, Dolja VV, Calvino LF, Lopez-Moya JJ, Burgyan J (2006). Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. EMBO J, 25: 2768~2780
 Lakatos L, Szittyta G, Silhavy D, Burgyan J (2004). Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by P19 protein of tombusviruses. EMBO J, 23: 876~884
 Lipardi C, Wei Q, Paterson BM (2001). RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNA that are degraded to generate new siRNAs. Cell, 107: 297~307

- Malloy AC, Reinhart BJ, Bartel D, Vance VB, Bowman LH (2002). A virus suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 15228~15233
- Merai Z, Kerenyi Z, Kertesz S, Magna M, Lakatos L, Silhavy D (2006). Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol*, 80: 5747~5756
- Merai Z, Kerenyi Z, Molnar A, Barta Z, Valoczi A, Biszray G, Havelda Z, Burgyan J (2005). Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. *J Virol*, 79: 7217~7226
- Morel JB, Godon C, Mourrain P, Beclin C, Boutet S, Feuerbach F, Proux F, Vaucheret H (2002). Fertile hypomorphic ARGONAUTE (*ago1*) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell*, 14: 629~639
- Nancy AE (2002). RNA goes mobile. *Plant Cell*, 14: 1433~1436
- Qu F, Ye XH, Hou GC, Sato S, Thomas EC, Morris TJ (2005). RDR6 has a broad-spectrum but temperature-dependent antiviral defense role in *Nicotiana benthamiana*. *J Virol*, 79: 15209~15217
- Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC (2001). Technical advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J* 25 (2): 237~245
- Ribarits A, Abdullaev A, Tashpulatov A, Richter A, Heberle-Bors E, Touraev A (2006). Two tobacco proline dehydrogenases are differentially regulated and play a role in early plant development. *Planta*, 15: Epub ahead of print
- Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 10: 937~946
- Schwach F, Vaistij FE, Jones L, Baulcombe DC (2005). An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiol*, 138: 1842~1852
- Silhavy D, Molnar A, Lucioli A, Szittya G, Hornyik C, Tavazza M, Burgyan J (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21 to 25 nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J*, 21: 3070~3080
- Simón-Mateo C, Garcia JA (2006). MicroRNA-guided processing impairs *Plum pox virus* replication, but the virus readily evolves to escape this silencing mechanism. *J Virol*, 80: 2429~2436
- Sizolwenkosi M, Olivier VM, Florian M, Marjori M, Herve V, Shou WD, Gail P, Vicki BV (2002). RNA silencing and the mobile silencing signal. *Plant Cell*, 14: S289~S301
- Szittya G, Silhavy D, Molnar A, Havelda Z, Lovas A, Lakatos L, Banfalvi Z, Burgyan J (2003). Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO J*, 22: 633~640
- Takeda A, Tsukuda M, Mizumoto H, Okamoto K, Kaido M, Mise K, Okuno T (2005). A plant RNA virus suppresses RNA silencing through viral RNA replication. *EMBO J*, 24: 3147~3157
- Teycheney PY, Tepfer M (2001). Virus-specific spatial differences in the interference with silencing of the *chs-A* gene in non-transgenic petunia. *J Gen Virol*, 82: 1239~1243
- Travella S, Klimm TE, Keller B (2006). RNA interference-based gene silencing as an efficient tool for functional genomics in hexaploid bread wheat. *Plant Physiol*, 142 (1): 6~20
- Voinnet O (2005). Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infection. *Nat Rev Genet*, 6: 206~220
- Voinnet O, Lederer C, Baulcombe DC (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell*, 103: 157~167
- Waterhouse PM, Fusaro AF (2006). Viruses face a double defense by plant small RNAs. *Science*, 313: 54~55
- Xoconostle-Cazares B, Xiang Y, Ruiz-Medrano R, Wang HL, Monzer J, Yoo BC, McFarland KC, Franceschi VR, Lucas WJ (1999). Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science*, 283: 94~98
- Yoo BC, Kragler F, Varkonyi-Gasic E, Haywood V, Archer-Evans S, Lee YM, Lough TJ, Lucas WJ (2004). A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell*, 16: 1979~2000
- Yu D, Fan B, Macfarlane SA, Chen Z (2003). Analysis of the involvement of an inducible *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. *Mol Plant Microbe Interact* 16 (3): 206~216