

植物病毒表达系统在木本作物研究中的应用

李欢, 孙丽英*

西北农林科技大学植物保护学院, 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西杨凌712100

摘要: 作为功能基因组学的重要工具, 植物病毒表达载体已广泛用于植物基因的表达调控及功能分析。一方面, 病毒表达载体作为瞬时表达技术在植物细胞内大量表达目标基因, 或是通过诱导基因沉默调控目标基因的表达水平; 另一方面, 植物病毒表达系统为植物品种更新提供了不同于转基因的另一种技术, 特别是针对那些生命周期长, 缺乏成熟转基因技术的植物, 病毒载体作为基因表达调控工具发挥着更重要的作用。目前认为, 利用植物病毒表达系统表达抗病基因, 或是诱导植物产生抗病反应是对自然生态影响较少的一种病虫害防控技术。本文重点介绍目前在多年生水果及坚果作物上适用的植物病毒表达载体, 讨论植物病毒表达技术在木本作物中的应用现状、特点及未来需要改进的地方。

关键词: 植物病毒表达系统; 木本作物; 基因表达调控

分子克隆与生物工程是推动植物科学发展的两大技术, 其中基因表达与调控技术在物种遗传改造、植物生理生化研究中发挥了重要作用。在植物科学研究领域, 基因表达与调控技术主要分两大类: 一是利用稳定表达技术, 即转基因技术, 将目标基因导入到植物基因组内, 外源基因可随植物基因组长期表达并遗传至后代; 二是利用瞬时表达技术, 外源基因由瞬时表达载体在植物细胞中(通常是细胞质中)进行表达, 并不随基因组遗传至后代。这两种基因表达技术各有优缺点, 可互为补充。植物病毒表达技术属于瞬时表达技术, 目前已广泛应用于植物科学的各个领域。对于那些遗传转化周期长, 成功率低, 遗传操作困难的植物, 植物病毒表达技术在验证其基因功能和调控基因表达方面, 发挥了尤为重要的作用。本文涉及的多年生木本植物生命周期长, 不仅常规遗传操作和分子育种时间远超草本植物, 而且其愈伤组织再生能力低, 外植体培育相对困难, 农杆菌介导的基因重组效率普遍较低, 使得转基因技术在木本植物的功能基因组研究中受到限制(李浚明和朱登云2002)。但是, 植物病毒表达技术可以不受这些因素的制约, 在木本作物的生物学研究和病虫害防控中发挥一定作用。虽然植物病毒表达技术在木本植物中的应用刚刚起步, 但已表现出巨大应用潜力。本文以苹果潜隐球状病毒(*Apple latent spherical virus*, ALSV)为例, 介绍植物病毒表达技术开发、应用及其使用特点, 讨论病毒表达技术在果树生物学研究中的应用现状及前景, 以期促进该项技术在木本作物生产研究中的应用。

1 植物病毒表达技术的发展现状

植物病毒表达技术是在分子克隆技术的基础上发展起来的。DNA重组技术使得植物病毒反向遗传操作成为可能。在反转录酶的作用下, RNA病毒基因组可在体外转录合成DNA, 即cDNA (complementary DNA), 在对cDNA进行特异性改造和克隆的基础上, 创造了兼具自我复制能力和表达外源基因能力的病毒侵染性克隆载体。病毒侵染性克隆是研究病毒基因功能, 探索病毒侵染、复制、运动、基因功能、致病机理等病毒的生命活动的重要工具(Baulcombe等1995; Takahashi等2007; Tatineni和Dawson 2012; Tatineni等2011; Tatineni等2008; Salazar-González等2015)。最早的植物病毒表达载体是将一些报告基因, 如荧光蛋白基因组合进病毒基因组, 构建了嵌合外源基因的病毒侵染性克隆, 用于实时观测病毒在寄主细胞间的侵染和运动(Baulcombe等1995)。到目前为止, 研究者已开发了一系列植物病毒表达载体。这些植物病毒表达载体除用于植物科学的研究外还用于商业生产, 小到微量的高价医药蛋白, 大到批量工业生产所需要的初提酶蛋白都可应用植物病毒表达技术来完成。例如, 近年来, 研究者利用植物病毒表达技术表达抗原、抗体, 并将之用于人类或其他动物疾病的诊治(Gleba等2004;

收稿 2016-03-10 修定 2016-4-26

资助 国家自然科学基金(31550110222)、西北农林科技大学基本科研业务费专项资金(Z109021510)和科研启动基金(Z111021404)。

* 通讯作者(E-mail: sunliying@nwsuaf.edu.cn)。

Canizares等2005; Li等2008)。因为外源基因嵌入到病毒基因组内,可随病毒基因组的复制而高水平表达,所以植物病毒表达技术的一个重要优点是外源基因可以随着病毒的侵染而在短期内大量表达。

迄今开发的植物病毒表达载体主要来源于侵染草本植物的病毒,如侵染茄科植物的马铃薯X病毒(*Potato virus X*, PVX)、马铃薯Y病毒(*Potato virus Y*, PVY),侵染单子叶植物的大麦条纹花叶病毒(*Barley stripe mosaic virus*, BSMV),以及可侵染多种草本植物的TMV、烟草脆裂病毒(*Tobacco rattle virus*, TRV)和豇豆花叶病毒(*Cowpea mosaic virus*, CPMV)等(Karasev 2000; Kurth等2012)。这些病毒得以开发和利用,一方面归功于其在理论研究上的深入,另一方面归功于其在实验操作技术方面的突破(Hefferon 2012; Lindbo等2001; Aguero等2012)。而侵染木本植物的病毒无论是在基础理论研究,还是病毒人工接种操作技术方面都滞后于侵染草本植物的病毒。如今,木本植物病毒表达载体的研究刚刚起步,能够成功开发并应用于实验和生产的木本植物病毒载体还非常有限。

2 苹果潜隐球状病毒表达载体的开发和应用

2.1 ALSV表达载体的构建

ALSV属豇豆镶嵌病毒科(Comoviridae),樱桃锉叶病毒属(*Cheravirus*),1978年在日本首次被发现。其病毒粒子为球状,直径约为25 nm,由3种外壳蛋白(coat protein, CP) VP25、VP20和VP24组装而成,分别包裹2条正义单链RNA基因组(RNA1和RNA2) (Li等2000)。ALSV具有不同的2种粒子组分: M和B,其中M含有2个分子量的RNA2,而B含有1个分子量的RNA1 (Li等2000)。基因组RNA1全长6 813个核苷酸(nucleotides, nt),3'端带有多聚腺苷酸poly(A),全长基因组含有一个开放阅读框(open reading frame, ORF),编码一个分子量为243 kDa的蛋白(图1-A)。氨基酸序列分析发现此蛋白含有蛋白酶伴侣蛋白、NTP结合的解旋酶活性中心、半胱氨酸水解酶及RNA合成酶的保守基元(motif),推测其为病毒RNA复制酶。RNA2全长3 385 nt,3'端也含有poly(A)。全长基因组含有一个ORF,编码一个分子量为108 kDa的多聚蛋白,多聚蛋白裂解后形成位于氮端的大小为42 kDa的运动蛋

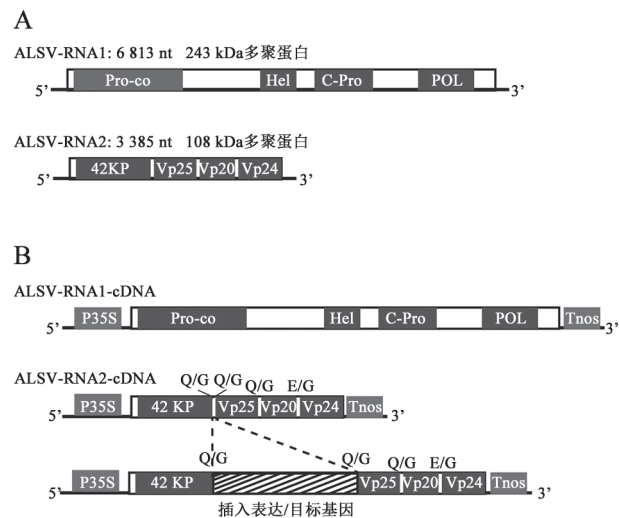


图1 苹果潜隐球状病毒(ALSV)基因组结构及ALSV表达载体构建图谱

Fig.1 Genomic organizations of ALSV RNA1 and RNA2 and schematic representation of ALSV based expression vector

A: ALSV野生型病毒基因组结构。ALSV包含2条单链RNA基因组片段, RNA1长6 813 nt, 编码243 kDa的多聚蛋白, 含有蛋白酶伴侣因子(protease cofactor, Pro-co)、NTP结合解旋酶(NTP-binding helicase, Hel)、半胱氨酸蛋白酶(cysteine protease, C-Pro)和RNA聚合酶(RNA polymerase, POL)等4个保守蛋白基元。RNA2长为3 385 nt, 编码108 kDa的多聚蛋白, 经蛋白酶剪切后形成42 kDa的运动蛋白(42KP)以及25 kDa (Vp25)、20 kDa (Vp20)和24 kDa (Vp24)三种外壳蛋白。B: ALSV侵染性克隆基础上构建的病毒表达载体。ALSV基因组5'端加入花椰菜花叶病毒启动子序列(cauliflower mosaic virus 35S promoter, P35S), 3'端加入胭脂碱合成酶终止子序列(nopaline synthase terminator, Tnos)。

白(movement protein, MP), 位于碳端的3个CP蛋白VP25、VP20和VP24(图1-A)。研究表明ALSV经嫁接或昆虫介体传播, 不经花粉和种子传播(Li等2000; Yoshikawa等2006; Isogai等2006; Nakamura等2011)。在自然状态下, ALSV主要侵染苹果、梨、樱桃等蔷薇科植物, 为潜隐性侵染, 通常不引起寄主植物发生病理学变化(Li等2000)。这些特点使得ALSV成为木本植物病毒表达载体的合适选择。

创制植物病毒表达载体的关键技术是获得可在cDNA水平上改造的病毒基因组遗传物质, 并可将之成功转入所需的植物细胞, 使其仍保留病毒在植物细胞中复制的能力。以RNA病毒为例, 完整的遗传操作体系包括从侵染的植株上分离纯化、获得病毒基因组遗传物质, 利用反向遗传学

技术(reverse genetics)构建病毒cDNA克隆,在cDNA克隆基础上进行病毒基因组改造,并将改造后获得的病毒遗传物质导入到植物细胞中,从而获得具有侵染能力的重组病毒。就ALSV而言,获得基因组遗传物质RNA1和RNA2后,利用反向遗传学技术, Li等(2000)首次构建并获得了ALSV侵染性cDNA克隆,在此基础上, Li等(2004)将外源基因嵌合进ALSV基因组RNA2中(图1-B),获得可表达外源基因的ALSV侵染性cDNA克隆,将体外合成的病毒基因组RNA导入模式植物昆诺黎(*Chenopodium quinoa*)或寄主植物苹果树原生质体细胞中,重组病毒都可在这些细胞中复制,并表达外源蛋白,如绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP) (Li等2004)。然而,与大多数草本植物病毒表达载体不同,无法用体外转录产物或农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的方法直接将ALSV-cDNA导入到苹果树植株中。目前采用的方法是先将ALSV-cDNA侵染性克隆经农杆菌介导接种至昆诺黎幼苗,重组病毒经昆诺黎体内繁育后再经摩擦接种或嫁接的方式导入苹果树幼苗。ALSV-cDNA携带的外源基因(如报告基因GFP)随病毒的系统性扩散而得以表达,因而在未接种病毒的新生叶片中也可检测到大量外源蛋白(Li等2004)。

2.2 ALSV超表达载体

植物病毒表达载体据其功能和使用目的,主要分为两类,一类为过表达或超表达载体(over expression vector, VOX),另一类为病毒诱导基因沉默载体(virus induced gene silencing, VIGS),两者都是功能基因组学的重要工具。ALSV-VOX载体的构建是建立在ALSV侵染性cDNA克隆的基础上(图1), Li等(2004)在RNA2 cDNA克隆,位于42 kDa (MP)蛋白及VP25 (CP)蛋白编码基因之间人工加入谷氨酰胺(glutamine, Q)/甘氨酸(glycine, G)蛋白酶酶切位点,在2个Q/G蛋白酶酶切位点间插入外源基因,外源蛋白随病毒基因表达后经蛋白酶剪切,从RNA2生成的多聚蛋白链上释放出来(图1-B)。此载体构建策略不仅保证了外源蛋白的完整性,而且尽可能减小外源基因对病毒生命活动的影响(Li等2004)。最初ALSV-VOX用来表达的外源基因为报告基因GFP,用于观察ALSV在寄主细胞中复制、运动等一系列病毒的生命活动。近

年来,研究者用ALSV-VOX过量表达某些寄主基因,分析其在调控植物生理生化过程中的生物学功能(Yamagishi等2011; Li等2010, 2013)。如Böhlenius等(2006)和Yamagishi等(2011)利用ALSV-VOX表达载体过表达促开花因子(FLOWERING LOCUS T, AtFT)和抑制开花因子(TERMINAL FLOWER 1, MdTFL1-1),验证其在调控苹果树生理周期中发挥了重要作用。ALSV表达载体在制备免疫抗体的研究中也取得了一系列进展。Li等(2014)利用DNA重组的方式将异源病毒的抗原决定簇基因与ALSV外壳蛋白基因融合,产生的融合蛋白携带有异源病毒的抗原小肽,并跟随ALSV外壳蛋白一起组装到ALSV病毒粒子上,提纯ALSV重组病毒粒子,免疫温血动物(如兔子等)便可获得高效价的特异性抗体。目前,利用此方法已成功获得西葫芦黄花叶病毒(*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV)和口蹄疫病毒(*Foot-and-mouth disease virus*)的高效特异抗体(Satoh 等2014)。这些成功的案例表明ALSV不仅在植物生物学研究方面,而且在医药生物工程方面都具有非常好的应用前景。

2.3 ALSV基因沉默表达载体

基因沉默是生物体内普遍存在,且进化上高度保守的一种基因表达调控机制。利用病毒载体诱导特异序列的基因发生沉默,从而抑制其表达是植物生命科学研究领域调控基因表达的常用策略。诱导生物体内发生基因沉默的因子为非正常RNAs (abnormal RNAs),多为双链RNAs (double strand RNAs, dsRNA),其来源或为生物体内基因组的转录产物,或为侵入的病毒、类病毒的基因产物,或者是可在细胞间运动的小RNAs (small RNAs, sRNAs),其分子机制涉及到一系列核酸酶和各种介导基因沉默的RNAs。其中,病毒诱导的基因沉默是由病毒复制过程中的中间体dsRNA为诱导起始因子,经类似RNAase III家族的特异性核酸内切酶(dicer-like protein, DCLs)催化降解成21~25 nt的小干扰RNA (small interfering RNAs, siRNAs)。siRNAs根据序列特异性反向互补于目标基因的mRNA,在其引导下DCLs对目标RNA进行特异性的剪切(Baulcombe 2004; Eamens等2008; Martínez等2013)。ALSV-VIGS的构建原理与ALSV-VOX一致,也是在ALSV RNA2 cDNA片段上位于42

kDa (MP)蛋白及VP25蛋白编码基因之间人工加入Q/G蛋白酶酶切位点,在2个Q/G蛋白酶酶切位点间插入目标基因(图1-B) (Igarashi等2009)。ALSV-RNA1和携带目标基因片段的ALSV-RNA2的侵染性克隆导入到植物细胞后,ALSV-VIGS诱导目标基因发生基因沉默,从而抑制目标基因的表达(Igarashi等2009)。迄今,ALSV-VIGS表达载体已在烟草、大豆、苹果等几种植物体内成功使用(Igarashi等2009)。

2.4 ALSV表达载体的特点

植物病毒表达载体的稳定性是评判其好坏的重要指标。目前认为植物病毒表达载体不稳定的主要原因有两种,一是病毒与寄主相互作用过程中,促进病毒基因组分子变异的选择压力比较大,加之病毒复制酶缺乏校对功能,病毒RNA在复制过程中错误率较高,导致病毒载体基因组分子变异高,侵染活性不稳定;二是病毒表达载体在复制过程中发生的基因组片段重组现象,由于表达载体内插入的外源基因不是病毒生命活动所必须,所以复制过程中有可能会通过基因组重组的方式将其剔除。例如早期开发的PVX和TMV表达载体都存在外源插入基因片段丢失的现象(Chapman等1992; Rabindran和Dawson 2001)。分析发现病毒基因序列中重复序列越多,重组率便越高,病毒载体就越不稳定(Donson等1991)。相比较而言,ALSV为潜隐型病毒,侵染植物寄主后通常不会导致病害发生,产生病症,暗示其与寄主相互作用过程中,所受到的选择压力较小,分析发现不同的ALSV分离株遗传变异不大,保守性相对较高(Li等2000)。Yoshikawa等人根据ALSV开发的病毒表达载体在使用中都表现出非常好的稳定性,插入外源基因片段发生剔除的概率小,针对不同植物使用时,ALSV载体都可稳定表达,在某些植物体内甚至可稳定表达2年以上(Li等2004; Sasaki等2011)。ALSV的这种稳定性一方面得益于病毒稳定性高,另一方面ALSV载体插入的外源基因表达后自病毒编码多聚蛋白MP和VP25间裂解下来,外源基因的表达不会显著影响病毒基因的功能和病毒侵染复制能力。另外,携带外源基因的ALSV表达载体病毒与野生病毒相比,它们在病毒复制和运动等方面并没有显著差别,这使得ALSV表达载体具有

相当的竞争能力,当出现病毒载体丢失外源基因恢复为野生型病毒时,载体病毒可与之竞争,仍然可以拥有一定数量的群体。而一般情况下,病毒表达载体的竞争能力要弱于野生型病毒。例如,以TMV表达载体,其竞争力要远低于野生型病毒,病毒载体的细胞间运动和系统性长距离运动能力都显著低于野生型病毒,因而,TMV表达载体很容易在竞争中失利,寄主细胞很快会被丢失外源基因的野生型病毒占据(Rabindran和Dawson 2001)。

ALSV病毒表达载体适用的植物比较广泛,除可应用于蔷薇科的木本植物外,还适用于多种草本植物(Igarashi等2009; Yamagishi等2009)。Igarashi等人通过实验证实ALSV-VIGS可在模式植物烟草、拟南芥,经济作物番茄、豆科,葫芦科等多种植物中高效诱导基因沉默(Igarashi等2009; Yamagishi等2009)。另外,ALSV表达载体应用灵活,可以同时进行两个或两个以上基因的表达调控。如Yamagishi等(2014)利用ALSV构建了双基因的双向表达调控系统(ALSV-AtFT/MdTFL1),即ALSV-VOX表达载体过表达促开花因子AtFT,同时用ALSV-VIGS载体抑制开花因子MdTFL1-1的表达。ALSV-AtFT/MdTFL1病毒表达载体侵染苹果树幼苗约2个月后,苹果树幼苗即可开花,几个月后结果,可显著缩短苹果树的生命周期(指种子开始萌发到下一代种子成熟的时间,苹果树一般需要5~12年),促进新品种的培育(Yamagishi等2014)。

3 其他应用于木本植物的病毒表达载体

除ALSV表达载体外,柑橘衰退病毒(*Citrus tristeza virus*, CTV)、柑橘叶斑病毒(*Citrus leaf blotch virus*, CLB)、洋李痘马铃薯Y病毒(*Plum pox potyvirus*, PPV)和葡萄病毒A (*Grapevine virus A*, GVA)等几种侵染木本植物的病毒已成功开发并应用于相关研究和生产中(Dawson等2015; Agüero等2012, 2014; Kamencayová等2014; Lovato等2014)。这些病毒载体的野生病毒都具有一个共同点,即它们的致病力弱,多为潜隐性病毒,侵染寄主植物后,通常不引起病害和病症或仅引起轻微病症(Dawson等2015)。例如CTV病毒表达载体开发自柑橘衰退病毒T30分离株,其致病能力很弱,侵染柑橘后不表现病症,而致病力强的柑橘衰退病毒株系T36则不适用于病毒载体的开发。虽然,

这些病毒都可经昆虫介体或嫁接进行传播,但它们侵染细胞具有不同的组织特异性,如ALSV、CLBV和PPV可在维管组织和叶肉细胞中扩散,而CTV和GVA具有组织局限性,病毒仅在韧皮部细胞中进行繁殖和扩散(Soler等2015)。通常,具有组织局限性的病毒载体,其表达外源基因的能力也会受到限制,但可通过相应的基因工程技术加以克服,例如在外源基因的末端添加信号肽,促使外源基因表达产物快速运输至细胞间隙,随细胞间隙的液流进行系统性扩散。

ALSV、PPV和GAV主要用于核果类、苹果、葡萄等木本植物的病毒表达载体。PPV是马铃薯Y病毒家族成员,基因组为单链正义RNA,基因组全长约10 kb,含有一个ORF,编码一条多肽链,由自身编码的蛋白质内切酶进行切割,最终形成13个成熟的基因产物。研究发现PPV病毒表达载体在桃树和杏树上可长期稳定表达GFP。GAV是Flexiviridae病毒家族的成员,研究者将启动子序列插入到GAV编码运动蛋白基因序列前,使GAV病毒复制时产生一个额外的亚基因组,从而用来表达外源基因。此载体在模式植物本氏烟(*N. benthamiana*)和葡萄植株上都可稳定表达外源基因GFP(Haviv等2006; Muruganatham等2009)。CLBV和CTV是应用于柑橘树的病毒表达载体。CLBV在分类上属于Betaflexiviridae家族,其基因组为8.7 kb大小的单链RNA,含有3个开放阅读框,分别编码病毒的RdRP、MP和CP(Vives等2002)。在CLBV侵染性克隆基础上,研究者构建出高效表达外源基因的VOX载体或诱导基因沉默的VIGS载体(Agüero等2012, 2014)。CTV在分类上隶属于长线型(Closteroviridae)病毒家族(Karasev等1995; Albiach-Mart等2000; Jacobsen和Schouten 2007),病毒基因组为单链RNA,长约20 kb。CTV在基因组结构及基因表达策略上都相对复杂,理论上CTV含有10条亚基因组,编码12个基因产物(Ayllón等2003)。CTV病毒载体构建策略是外源基因插入在CP与CPm之间,随CP基因一起表达(Ayllón等2004, 2005)。虽然CTV侵染复制具有韧皮部局限性,但与全细胞侵染的TMV相比,其表达外源基因(GFP)的能力没有明显差异(Ayllón等2005)。目前,CTV表达载体不仅是研究病毒侵染循环等生命活动的

重要工具,也广泛用于柑橘的抗病育种和田间病虫害防治(Dawson等2015)。

4 讨论

最初,植物病毒表达载体主要被用来研究植物-病毒相互作用,分析病毒侵染、复制、扩散等理论问题。然而近年来,植物病毒载体也逐渐应用到了抗病育种、病害综合防治等农业生产中,特别是针对那些短时间暴发流行的重要病害,如CTV表达载体被用来防治柑橘黄龙病(huanglongbing, HLB)。最初研究者利用CTV表达载体筛选抗黄龙病基因,然后利用生物技术将抗病基因转入柑橘植株内,以培育出相应的抗病品种,但是从利用转基因技术获得稳定表达抗病基因的植株到获得商品生产安全许可,一般需要15年以上的时间,之后从推广抗病苗木到果园成熟则需要另外10~15年,因而对柑橘产业来说,此法难解燃眉之急。于是,研究者利用CTV表达载体在柑橘植株内获得长期、稳定表达的抗黄龙病外源基因,成功抑制了黄龙病的发生和蔓延。因而在成功获得抗病品种前,病毒表达载体可替代转基因策略进行病害防治。CTV可经嫁接传播,易于操作,因而CTV介导的抗黄龙病技术很容易在田间推广。目前在北美地区,很多未感染黄龙病的柑橘植株也预先接种CTV表达载体(携带抗黄龙病的基因)以预防黄龙病的侵染(Dawson等2015)。

不仅VOX可以表达抗病基因,用于木本作物病虫害防治,VIGS诱导的基因沉默也能用来进行病虫害防治。基因沉默现象是植物长期进化形成的一种固有的生物免疫系统,是植物体用来防止外来遗传物质干扰自身基因组功能和稳定性的重要抗病机制。细胞内一旦诱导发生基因沉默,生成的siRNAs便在寄主细胞内扩散,并可通过植物维管系统进行快速的系统性扩散,特异性的抑制靶标基因的表达(Baulcombe 2004; Eamens等2008; Martínez等2013)。在生产中研究者经常使用特异性表达异源病毒的基因组片段来抵抗强致病力病毒的侵染。除此之外,最近研究发现,丝状菌,如真菌(fungi)和卵菌(oomycetes)在侵染植物时,可以和寄主植物交换siRNAs,也就是说siRNAs可以在不同物种间进行跨界扩散。因而,VIGS可以靶标到丝状病原菌的遗传物质,干扰其稳定表达,从而

抑制病原菌对植物的侵害(Panwar等2013; Helber等2011; Vega-Arreguín等2014)。目前,研究者利用病毒表达载体在植物体内诱导产生靶标到丝状菌感染或毒性相关基因的siRNAs,已经取得了很好的抗病效果(Taki等2013; Tamura等2013)。

作为重要的基因工程技术工具,植物病毒载体可显著缩短木本植物育种的时间而得到很多育种家的关注。一般木本植物的幼树期比较长,传统杂交育种的周期远远长过草本植物。重要的是很多优良品种的杂交亲本不清晰,为保持品种的重要性状不丢失,比较好的方法是将改良基因通过转基因的方式插入到目标植物的基因组中,从而获得新的改良品种。然而很多木本植物如苹果、樱桃、梨、桃子等缺乏高效的再生系统,遗传转化效率也相对较低,获得的转基因植株需要1年时间才长成幼苗,需要更长的时间(5~20年)去验证转基因的功效。而病毒表达载体完全可以弥补这一缺憾,它可快速检测和鉴定相关基因的功效,从而提高转基因的目的性和成功性。利用病毒表达载体进行木本植物基因功能研究的优点有很多,例如基因表达的细胞环境比较一致,所有的待选基因都是在同样生物条件下进行表达,而利用转基因策略表达的基因,每个转化个体都不相同,需要构建出很多不同的转基因株系,才能评价待测基因的功能,需要投入更多的人力和物力。另外,病毒载体可成功接种任何树龄的植株,根据不同的时空需要进行基因的表达调控。由于木本作物为多年生植物,大多木本经济作物在生长中期或产量最高时受到病虫害威胁,因而相对应的抗病基因可由病毒表达载体在适当时期转入成熟植株中进行表达,发挥其抗病功能。

参考文献

- Agüero J, Ruiz-Ruiz S, Del Carmen Vives M, Velázquez K, Navarro L, Peña L, Moreno P, Guerri J (2012). Development of viral vectors based on *Citrus leaf blotch virus* to express foreign proteins or analyze gene function in citrus plants. *Mol Plant Microbe Interact*, 25 (10): 1326–1337
- Agüero J, Vives Mdel C, Velázquez K, Pina JA, Navarro L, Moreno P, Guerri J (2014). Effectiveness of gene silencing induced by viral vectors based on *Citrus leaf blotch virus* is different in *Nicotiana benthamiana* and citrus plants. *Virology*, 460–461: 154–164
- Albiach-Martí MR, Mawassi M, Gowda S, Satyanarayana T, Hilf ME, Shanker S, Almira EC, Vives MC, López C, Guerri J, et al (2000). Sequences of *Citrus tristeza virus* separated in time and space are essentially identical. *J Virol*, 74: 6856–6865
- Ayllón MA, Gowda S, Satyanarayana T, Dawson WO (2004). *Cis*-acting elements at opposite ends of the *Citrus tristeza virus* genome differ in initiation and termination of subgenomic RNAs. *Virology*, 322: 41–50
- Ayllón MA, Gowda S, Satyanarayana T, Karasev AV, Adkins S, Mawassi M, Guerri J, Moreno P, Dawson WO (2003). Effects of modification of the transcription initiation site context on *Citrus tristeza virus* subgenomic RNA synthesis. *J Virol*, 77: 9232–9243
- Ayllón MA, Satyanarayana T, Gowda S, Dawson WO (2005). An atypical 3'-controller element mediates low-level transcription of the p6 subgenomic mRNA of *Citrus tristeza virus*. *Mol Plant Pathol*, 6: 165–176
- Baulcombe DC (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, 431: 356–363
- Baulcombe DC, Chapman S, Cruz SS (1995). Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J*, 7: 1045–1053
- Böhlenius H, Huang T, Charbonnel-Campaa L, Brunner AM, Jansson S, Strauss SH, Nilsson O (2006). *CO/FT* regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science*, 312 (5776): 1040–1043
- Canizares MC, Nicholson L, Lomonosoff GP (2005). Use of viral vectors for vaccine production in plants. *Immunol Cell Biol*, 83: 263–270
- Chapman S, Kavanagh T, Baulcombe D (1992). *Potato virus X* as a vector for gene expression in plants. *Plant J*, 2: 549–557
- Dawson WO, Bar-Joseph M, Garnsey SM, Moreno P (2015). *Citrus tristeza virus*: making an ally from an enemy. *Annu Rev Phytopathol*, 53: 137–155
- Donson J, Kearney CM, Hilf ME, Dawson WO (1991). Systemic expression of a bacterial gene by a tobacco mosaic virus-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 7204–7208
- Eamens A, Wang M-B, Smith NA, Waterhouse PM (2008). RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. *Plant Physiol*, 147: 456–468
- Gleba Y, Marillonnet S, Klimyuk V (2004). Engineering viral expression vectors for plants: the 'full virus' and the 'deconstructed virus' strategies. *Curr Opin Plant Biol*, 7: 182–188
- Haviv S, Galiakparov N, Goszczynski DE, Batuman O, Czosnek H, Mawassi M (2006). Engineering the genome of *Grapevine virus A* into a vector for expression of proteins in herbaceous plants. *J Virol Methods*, 132: 227–231
- Hefferon KL (2012). Plant virus expression vectors set the stage as production platforms for biopharmaceutical proteins. *Virology*, 433: 1–6
- Helber N, Wippel K, Sauer N, Schaarschmidt S, Hause B, Requena N (2011). A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp is crucial for the symbiotic relationship with plants. *Plant Cell*, 23: 3812–3823
- Igarashi A, Yamagata K, Sugai T, Takahashi Y, Sugawara E, Tamura A, Yaegashi H, Yamagishi N, Takahashi T, Isogai M, Takahashi H,

- et al (2009). *Apple latent spherical virus* vectors for reliable and effective virus-induced gene silencing among a broad range of plants including tobacco, tomato, *Arabidopsis thaliana*, cucurbits, and legume. *Virology*, 386 (2): 407–416
- Isogai M, Watanabe K, Uchidate Y, Yoshikawa N (2006). Protein-protein- and protein-RNA-binding properties of the movement protein and VP25 coat protein of *Apple latent spherical virus*. *Virology*, 352: 178–187
- Jacobsen E, Schouten HJ (2007). Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants. *Trends Biotechnol*, 25: 219–223
- Kamencayová M, Košík I, Hunková J, Subr ZW (2014). Transient expression of the influenza A virus PB1-F2 protein using a plum pox virus-based vector in *Nicotiana benthamiana*. *Acta Virol*, 58 (3): 274–277
- Karasev AV, Boyko VP, Gowda S, Nikolaeva OV, Hilf ME, Koonin EV, Niblett CL, Cline K, Gumpf DJ, Lee RF, et al (1995). Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. *Virology*, 208: 511–520
- Karasev AV (2000). Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Annu Rev Phytopathol*, 38: 293–324
- Kurth EG, Peremyslov VV, Prokhnevsky AI, Kasschau KD, Miller M, Carrington JC, Dolja VV (2012). Virus-derived gene expression and RNA interference for grapevine. *J Virol*, 86: 6002–6009
- Li C, Sasaki N, Isogai M, Yoshikawa N (2004). Stable expression of foreign proteins in herbaceous and apple plants using *Apple latent spherical virus* RNA2 vectors. *Arch Virol*, 149: 1541–1558
- Li C, Wei Z, Liang D, Zhou S, Li Y, Liu C, Ma F (2013). Enhanced salt resistance in apple plants overexpressing a *Malus vacuolar Na⁺/H⁺* antiporter gene is associated with differences in stomatal behavior and photosynthesis. *Plant Physiol Biochem*, 70: 164–173
- Li C, Yamagishi N, Kaido M, Yoshikawa N (2014). Presentation of epitope sequences from foreign viruses on the surface of *apple latent spherical virus* particles. *Virus Res*, 190: 118–126
- Li C, Yoshikawa N, Takahashi T, Ito T, Yoshida K, Koganezawa H (2000). Nucleotide sequence and genome organization of *Apple latent spherical virus*: a new virus classified into the family *Comoviridae*. *J Gen Virol*, 81: 541–547
- Li JM, Zhu DY (2002). *Course of Plant Tissue Culture*. Beijing: China Agricultural University Press (in Chinese) [李浚明, 朱登云 (2002). *植物组织培养教程*. 北京: 中国农业大学出版社]
- Lico C, Chen Q, Santi L (2008). Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. *J Cell Physiol*, 216: 366–377
- Lindbo JA, Fitzmaurice WP, Della-Cioppa G (2001). Virus-mediated reprogramming of gene expression in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 4: 181–185
- Lovato A, Faoro F, Gambino G, Maffi D, Bracale M, Polverari A, Santi L (2014). Construction of a synthetic infectious cDNA clone of *Grapevine Algerian latent virus* (GALV-Nf) and its biological activity in *Nicotiana benthamiana* and grapevine plants. *Virol J*, 11: 186
- Martínez de Alba AE, Elvira-Matlot E, Vaucheret H (2013). Gene silencing in plants: a diversity of pathways. *Biochim Biophys Acta*, 1829: 1300–1308
- Muruganatham M, Moskovitz Y, Haviv S, Horesh T, Fenigstein A, du Preez J, Stephan D, Burger JT, Mawassia M (2009). *Grapevine virus A*-mediated gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Vitis vinifera*. *J Virol Methods*, 155: 167–174
- Nakamura K, Yamagishi N, Isogai M, Komori S, Ito T, Yoshikawa N (2011). Seed and pollen transmission of *Apple latent spherical virus* in apple. *J Gen Plant Pathol*, 77: 48–53
- Panwar V, McCallum B, Bakkeren G (2013). Host-induced gene silencing of wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* pathogenicity genes mediated by the *Barley stripe mosaic virus*. *Plant Mol Biol*, 81: 595–608
- Rabindran S, Dawson WO (2001). Assessment of recombinants that arise from the use of a TMV-based transient expression vector. *Virology*, 284: 182–89
- Salazar-González JA, Banuelos-Hernández B, Rosales-Mendoza S (2015). Current status of viral expression system in plants and perspectives for oral vaccines development. *Plant Mol Biol*, 87: 203–217
- Sasaki S, Yamagishi N, Yoshikawa N (2011). Efficient virus-induced gene silencing in apple, pear and Japanese pear using *Apple latent spherical virus* vectors. *Plant Methods*, 7: 15
- Satoh N, Kon T, Yamagishi N, Takahashi T, Natsuaki T, Yoshikawa N (2014). *Apple latent spherical virus* vector as vaccine for the prevention and treatment of mosaic diseases in pea, broad bean, and eustoma plants by *Bean yellow mosaic virus*. *Viruses*, 6 (11): 4242–4257
- Soler N, Fagoaga C, López C, Moreno P, Navarro L, Flores R, Peña L (2015). Symptoms induced by transgenic expression of p23 from *Citrus tristeza virus* in phloem-associated cells of Mexican lime mimic virus infection without the aberrations accompanying constitutive expression. *Mol Plant Pathol*, 49 (3): 456–465
- Takahashi T, Sugawara T, Yamatsuta T, Isogai M, Natsuaki T, Yoshikawa N (2007). Analysis of the spatial distribution of identical and two distinct virus populations differently labeled with cyan and yellow fluorescent proteins in coinfecting plants. *Phytopathology*, 97: 1200–1206
- Taki A, Yamagishi N, Yoshikawa N (2013). Development of *apple latent spherical virus*-based vaccines against three tospoviruses. *Virus Res*, 176: 251–258
- Tamura A, Kato T, Taki A, Sone M, Satoh N, Yamagishi N, Takahashi T, Ryo B, Natsuaki T, Yoshikawa N (2013). Preventive and curative effects of *Apple latent spherical virus* vectors harboring part of the target virus genome against potyvirus and cucumovirus infections. *Virology*, 446: 314–324
- Tatineni S, Dawson WO (2012). Enhancement or attenuation of disease by deletion of genes from *Citrus tristeza virus*. *J Virol*, 86: 7850–7857
- Tatineni S, McMechan AJ, Hein GL, French R (2011). Efficient and stable expression of GFP through *Wheat streak mosaic virus*-based vectors in cereal hosts using a range of cleavage sites: formation of dense fluorescent aggregates for sensitive virus tracking. *Virology*, 410: 268–281
- Tatineni S, Robertson CJ, Garnsey SM, Bar-Joseph M, Gowda S, Dawson WO (2008). Three genes of *Citrus tristeza virus* are dis-

- pensable for infection and movement throughout some varieties of citrus trees. *Virology*, 376: 297–307
- Vega-Arreguín JC, Jalloh A, Bos JI, Moffett P (2014). Recognition of an Avr3a homologue plays a major role in mediating nonhost resistance to *Phytophthora capsici* in *Nicotiana* species. *Mol Plant Microbe Interact*, 27: 770–780
- Vives MC, Galipienso L, Navarro L, Moreno P, Guerri J (2002). Characterization of two kinds of subgenomic RNAs produced by citrus leaf blotch virus. *Virology*, 295 (2): 328–336
- Yamagishi N, Kishigami R, Yoshikawa N (2014). Reduced generation time of apple seedlings to within a year by means of a plant virus vector: a new plant-breeding technique with no transmission of genetic modification to the next generation. *Plant Biotechnol J*, 12 (1): 60–68
- Yamagishi N, Sasaki S, Yamagata, K, Komori S, Nagase M, Wada M, Yamamoto T, Yoshikawa N (2011). Promotion of flowering and reduction of a generation time in apple seedlings by ectopical expression of the *Arabidopsis thaliana FT* gene using *Apple latent spherical virus* vector. *Plant Mol Biol*, 75: 193–204
- Yamagishi N, Yoshikawa N (2009). Virus-induced gene silencing in soybean seeds and the emergence stage of soybean plants with *Apple latent spherical virus* vector. *Plant Mol Biol*, 71: 15–24
- Yoshikawa N, Okada K, Asamura K, Watanabe K, Igarasi A, Li C, Isogai M (2006). A movement protein and three capsid proteins are all necessary for the cell-to-cell movement of apple latent spherical cheravirus. *Arch Virol*, 151 (5): 837–848

The use of plant virus-based expressing systems in woody crops

LI Huan, SUN Li-Ying*

State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China

Abstract: As an important functional genomics tools, plant virus-based vectors have been widely used for the gene expression system and functional genetic analysis in plants. Plant viral vectors could be used to express foreign genes and then investigating their effects on the plants, or the other way, used for reverse genetic analysis by inhibition of the cellular gene expressions through the induction of RNA silencing. The plant virus-based vector system is especially important because there are many crop plants with long life cycles or no efficient conventional gene transformation technique available. Thus, the plant virus-based vectors provide the researchers with an alternative yet convenient experimental tool. In addition, plant viral vector system could also be implemented in the crop field to express the defense-related proteins that protect the plants against pathogens and pests. This novel crop protection approach seems to have an advantage over the chemical control method, due to its less negative impact on the bio-environment. This review focuses on viral vectors currently used in woody fruit and nut crops. The recent developments, features, and improvements of plant virus-based expression techniques were also discussed.

Key words: plant virus-based expressing system; woody crops; gene expression and regulation

Received 2016-03-10 Accepted 2016-04-26

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31550110222), Northwest A&F University Basic Research Funds (Grant No. Z109021510) and Scientific Research Fund (Grant No. Z111021404).

*Corresponding author (E-mail: sunliying@nwsuaf.edu.cn).