

植物小RNA在病毒致病过程中的作用研究进展

邱艳红 王超楠 张永江 朱水芳*

(中国检验检疫科学研究院植物检疫研究所, 北京 100176)

摘要: 目前,我国正遭受多种外来有害生物的入侵,给我国的农业生产以及生态环境造成了严重影响。其中检疫性植物病毒危害大、隐蔽性强,是重要的外来生物。掌握病毒致病的相关机制是有效防控入侵病毒病害的基础。微小RNA(microRNA, miRNA)以及病毒小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)是植物体内重要的非编码小RNA,在病毒致病过程中扮演着重要角色。病毒在侵染过程中,可以利用植物抗病毒免疫反应产生的siRNA进行致病,同时可以直接或间接干扰miRNA的代谢途径,导致相关症状的产生。本文根据植物小RNA的近期研究进展,对miRNA和病毒siRNA的产生途径、生物学特性以及作用分子机制进行了综述,并对其在病毒侵染过程中的作用进行了探讨,初步从小RNA的角度阐述了植物病毒的致病机制,以期为检疫性病毒病害的防控提供理论基础。

关键词: miRNA; siRNA; 植物病毒; 致病机制

Research advances in the roles of plant small RNAs during viral pathogenicity

Qiu Yanhong Wang Chaonan Zhang Yongjiang Zhu Shuifang*

(Institute of Plant Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China)

Abstract: At present, China is suffering from a variety of invasive species, which seriously influences the agricultural products and ecological environment. The quarantine plant viruses are the important exotic species, as their damages are great and usually hard to be detected. It is essential to understand the related mechanisms of viral diseases for effectively preventing and controlling plant viruses. The microRNA (miRNA) and viral small interfering RNA (siRNA) are both very important non-encoding small RNAs in plants and play important roles during viral infection. The viruses use the siRNAs that are produced during the plant anti-virus immunity response to induce diseases, and also interfere in the metabolic pathways of miRNAs directly or indirectly. Based on recent research advances in small RNAs in plants, the production pathway, the biological characteristics and the molecular mechanisms of viral siRNAs and miRNAs were summarized, and the roles of small RNAs during viral infection were also discussed, which preliminarily explored the pathogenic mechanisms of plant viruses from the perspectives of plant small RNAs and provided the theoretical basis for the prevention and control of quarantine viruses.

Key words: miRNA; siRNA; plant virus; pathogenic mechanism

随着全球化进程的加速及对外贸易的扩大,外来生物入侵我国的风险也与日俱增。病毒类外来有

害生物一旦入侵我国将会严重影响粮食作物、园艺作物以及经济作物的生产,并且病毒可以随着种子

基金项目: 中国检验检疫科学研究院基本科研业务费(2017JK035)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: zhushf@caiq.gov.cn

收稿日期: 2018-11-19

或种苗远距离传播,这就使得检疫性植物病毒成为我国重点防控的入侵生物。病毒对寄主植物的影响是多方面的,病毒的致病机制也是复杂多样的。多年来,病毒学家从病毒致病因子、寄主效应因子、病毒与寄主互作关系等多方面对病毒致病的关键机制进行了探讨,并希望找到抗病毒的关键方法和策略。近几年来,植物小RNA成为生命科学领域的一个研究热点,随着对其生物学特性以及生物学功能研究的日渐深入,对病毒致病机制的研究也产生了深远影响。本文将系统综述微小RNA (microRNA, miRNA) 以及病毒小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA) 在病毒侵染寄主植物过程中的作用,拟从植物小RNA方面探讨病毒致病的相关机制,以期对检疫性植物病毒病害的深入研究和防控提供理论参考。

1 植物体内主要的小RNA

植物在生长过程中不可避免的要遭受各种逆境胁迫,如高温、干旱、病虫害等,因而植物在长期的逆境胁迫中进化出了复杂的RNA沉默(RNA silencing)机制来参与调控植物的生长发育、信号转导、蛋白质降解等途径,以抵抗各种病原菌的入侵以及应对高温、干旱等生物或非生物环境胁迫。RNA沉默途径是复杂多样的,而其共同的特征就是能产生约为21~24个核苷酸(nucleotide, nt)的小RNA。其中miRNA和siRNA是植物体内重要的非编码小RNA,在病毒致病过程中扮演着重要角色。miRNA主要用于调节植物内源基因的表达,以保证植物正常的生长发育过程(Liu et al., 2017);而在病毒诱导的基因沉默通路中产生的大量病毒siRNA,主要用于抵御入侵的病毒从而达到抗病毒的目的(Ding, 2010)。虽然miRNA和病毒siRNA的产生途径与生物学功能均不相同,但二者又相互联系、相互影响。本文就miRNA和病毒siRNA的产生途径以及生物学功能等分别展开探讨。

1.1 RNA沉默

RNA沉默现象又名RNA干扰(RNA interfering, RNAi),是近年来发现的一种高度保守且普遍存在的基因表达调控机制,是一种利用序列特异性的小RNA对基因实现沉默的现象。早期,科学家就发现可以通过在植物中表达部分病毒的基因组以免疫该种病毒或者相似病毒的侵染。Napoli et al. (1990)向矮牵牛中转入了强启动子调控的多拷贝色

素合成酶基因,希望获得花色能够加深的转基因后代,然而该方法并没有获得花色增强的植株,反而导致一些植株花朵杂色或无色,说明不仅转入的基因失活,同时也影响了内源的同源基因表达,这是首次发现的RNA沉默现象,最初命名为共抑制(cosuppression)。之后,Fire et al. (1998)将这一过程命名为RNA干扰。现在,将由RNA介导的通过核酸序列特异性相互作用来抑制同源基因表达的现象称为RNA沉默。通常在线虫或果蝇中叫作RNA干扰,在植物中称为转录后基因沉默(posttranscriptional gene silence, PTGS),而在真菌中则称为抑制(quelling),另外还包括病毒诱导基因沉默(virus induced gene silence, VIGS)(Tijsterman et al., 2002)。其核心是在细胞内产生的或外源导入的双链RNA(double strand RNA, dsRNA)被核酸内切酶Dicer切割成的小RNA;小RNA与Argonaute(AGO)酶等进一步结合形成基因沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC),并通过序列互补方式作用于靶标mRNA,导致靶标基因被切割为短的片段或翻译受到抑制(Islam et al., 2017; Rosa et al., 2018)。

1.2 植物miRNA的产生途径

miRNA是属于植物内源约为22 nt的非编码小RNA,是植物生长发育的重要调节因子(Khraiweh et al., 2012)。miRNA最先于线虫中被发现。Lee et al. (1993)利用图位克隆的方法在秀丽隐杆线虫*Caenorhabditis elegans*中发现并克隆了世界上第1个miRNA——*lin-4*, *lin-4*基因可以通过产生一种只有22 nt大小的小RNA来抑制*lin-14*基因的翻译过程,从而阻碍线虫幼虫从L1期向L2期的生长转变。之后,Reinhart et al. (2000)发现了另一个线虫miRNA——*let-7*, *let-7*基因通过调控靶基因*lin-41*来控制线虫从幼虫到成虫的发育过程。由于它们在发育时序的控制中发挥重要作用,因此最初被称为小分子时序RNA (small temporal RNA, stRNA)。随后, Llave et al. (2002)从拟南芥中鉴定出了第1个植物miRNA——miR171。目前,在生物技术快速发展的推动下,越来越多的miRNA被鉴定出来,同时也打开了miRNA的研究大门。

miRNA的前体是植物细胞核内MIR基因转录出的具有茎环结构的初级转录本(primary transcript, pri-miRNA), pri-miRNA折叠成二级茎环结构,在DCL1 (Dicer-like 1)的2次剪切作用下产生miRNA/miRNA*复合体;该复合体在HEN1 (Hua

Enhancer 1)的作用下,其3'端被甲基化,然后被运输到细胞质中;miRNA/miRNA*复合体进入细胞质后其一条链被降解,一条链进入AGO蛋白形成基因沉默复合体。植物miRNA对靶基因的调控方式主要有2种类型:一种是大部分miRNA与信使RNA(messenger RNA, mRNA)表现完全互补,并指导mRNA的特异性切割,引发靶基因的降解;另一种是小部分miRNA与mRNA不完全互补,抑制靶基因的翻译(Finnegan & Pasquinelli, 2013; Borges & Martienssen, 2015)。

由于植物大多数的miRNA与靶基因几乎完全互补,而且通常在互补位点第10个或者第11个位点对靶基因进行切割,其中一段切割片段会含有一个5'单磷酸和3' polyA尾巴。利用该特性可以用一个特异性识别5'单磷酸RNA的接头将该mRNA片段捕获,然后构建cDNA文库,通过高通量测序技术就可以获得该片段的序列,进一步与已知数据库中的相关序列进行比对,最后获得miRNA的靶基因序列。该技术被称为降解组测序技术(German et al., 2008)。目前,我国利用该技术已经成功对水稻(Li et al., 2010a)、黄瓜(Mao et al., 2012)等植物中miRNA的靶基因进行了检测。此外,miRBase数据库包含了大量的miRNA序列信息及其靶基因信息,科研人员可以直接利用序列在线工具搜索已知miRNA的靶标信息(<http://www.mirbase.org>),这为miRNA-靶mRNA的研究提供了有利帮助。

1.3 病毒siRNA的产生途径

病毒siRNA是一类长约20~30 nt的非编码RNA分子,是植物抗病毒免疫反应的重要中间产物。其产生的前体是病毒在复制过程中形成的dsRNA或者是基因局部形成的二级机构,能够被植物的DCL蛋白所识别,然后将其切割成为约21~24 nt的siRNA。siRNA进入AGO蛋白后形成基因沉默复合体,利用碱基互补的原则作用于靶基因,在转录水平和转录后水平作用于病毒的RNA,从而起到抗病毒的作用。该阶段产生的siRNA被称为初级siRNA,而初级siRNA切割靶基因的产物可在植物体内RDR6的作用下再次扩增形成dsRNA,并由DCL蛋白进一步剪切产生次级siRNA(Ding, 2010)。该过程被称为病毒诱导基因沉默,是植物重要的抗病毒免疫机制(Pallas & Garcia, 2011)。

与miRNA相比,病毒siRNA是由外源性转录基因所产生;此外,病毒siRNA是由dsRNA转变而来

的,而miRNA是由具有发夹结构的pre-miRNA加工而来;最后病毒siRNA主要以双链形式存在,与病毒靶基因的结合是完全互补配对的,而miRNA主要以单链形式存在,与靶RNA的结合并不完全互补,存在错配现象(Ding, 2010; Islam et al., 2017)。

2 miRNA在病毒致病过程中的作用

植物在生长发育过程中,不可避免地受到生物和非生物环境因素的影响。而植物则进化出了以miRNA介导的错综复杂的分子网络,在转录后水平作用于植物内源基因,从而调控植物的生长发育过程(Khraiweh et al., 2012)以及参与植物应对逆境胁迫过程(Kumar, 2014)。随着二代测序技术的发展,越来越多的植物miRNA被鉴定出来,而其生物学功能的研究也越来越深入。近几年来,miRNA在植物病毒侵染过程中的作用也成为了病毒研究热点(Bazzini et al., 2007; Baldrich & San Segundo, 2016; Liu et al., 2017)。

2.1 miRNA介导的抗病毒反应

研究发现,植物miRNA不仅参与调控植物的生长发育,而且在调节植物免疫应答方面也具有重要作用,如miRNA可以通过调控植物病原物相关分子模式触发的免疫反应和效应因子触发的免疫反应进行抗病毒反应(Li et al., 2012; Park & Shin, 2015)。当病毒进入植物细胞后,就会被植物细胞膜表面的模式识别受体(plasma membrane-localized pattern-recognition receptor, PRR)所识别,即病原物相关的分子识别模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP),其相关的防卫反应被称为病原物相关分子模式触发的免疫(PAMP-triggered immunity, PTI),也是植物的第一层免疫反应。病原物为了抑制寄主的PTI反应,进化出了多种效应因子,能够进入到植物细胞中干扰PTI反应。而这些效应因子会继续被植物抗性蛋白(R蛋白)特异性识别并引发强烈的抗病反应,即植物的第二层免疫反应——效应因子触发的免疫反应(effector-triggered immunity, ETI)(Jones & Dangl, 2006; Muthamilarasan & Prasad, 2013; Ramirez-Prado et al., 2018)。而这些抗性蛋白主要是由R基因所编码,多数属于NB-LRR受体蛋白,即中间结构域含有1个核苷酸结合位点(nucleotide binding, NB),C端含有1个亮氨酸的富集区(leucine-rich repeat, LRR)以及N端含有白细胞介素受体(toll/interleukin-receptor, TIR)结构或者卷曲螺旋

(coiled coil, CC)结构。NB-LRR受体蛋白可以直接或者间接识别病原物的效应因子,引起过敏性坏死反应,导致局部侵染的细胞快速坏死,从而将病原物限制在侵染位点(Coll et al., 2011; Mandadi & Scholthof, 2013)。研究证明miRNA参与PTI和ETI的抗病反应(Islam et al., 2017)。其最直接的证据是在miRNA活性受到影响的拟南芥*dcl1-29*、*ago1-25*和*ago1-27*突变体中,病原菌侵染所引起的PTI反应也受到了影响(Li et al., 2010b)。在烟草中,*N*基因是第1个被分离出来的抗病毒*R*基因,其编码的蛋白属于NB-LRR类蛋白。当烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)侵染含有*N*基因的烟草时,*N*蛋白可以通过自身的TIR结构域来间接识别TMV复制酶的螺旋结构域p50,并进一步与*N*蛋白的受体互作蛋白1(*N receptor-interacting protein 1*, NRIP1)进行互作,使NRIP1从叶绿体中转移至细胞质和细胞核中,从而引发细胞的过敏性坏死反应(Caplan et al., 2008)。研究发现,当病毒侵染烟草时,烟草的miR482会下调,导致其作用的*NBS-LRR*基因上调,从而应对病毒的侵染。除了miR482之外,在烟草中还鉴定出了miR6019和miR6020,也可以作用于编码TIR结构域的*N*基因(Li et al., 2010b; Moon & Park, 2016)。

2.2 miRNA介导的病毒致病过程

研究表明,病毒侵染可诱导或抑制一些寄主的miRNA。如马铃薯Y病毒(*Potato virus Y*, PVY)侵染烟草后可引起寄主体内多个miRNA和大量mRNA发生变化(Guo et al., 2017);黄瓜绿斑驳花叶病毒(*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV)侵染西瓜后可影响377个已知miRNA和246个新miRNA的表达,这些已知miRNA调控的mRNA涉及多个生物学过程,如植物激素信号传导、抗病相关蛋白、初级和次级代谢等过程(Sun et al., 2017);此外,还有甘蔗花叶病毒(*Sugarcane mosaic virus*, SCMV)对玉米体内miRNA的影响(Xia et al., 2018)等。而这些miRNA的变化与寄主的症状发展息息相关(Bazzini et al., 2007; Sun et al., 2015; Tong et al., 2017)。如TMV、番茄花叶病毒(*Tomato mosaic virus*, ToMV)、马铃薯X病毒(*Potato virus X*, PVX)、烟草蚀纹病毒(*Tobacco etch virus*, TEV)以及PVY同时侵染烟草时,侵染症状严重程度依次为TMV、ToMV、PVX、TEV及PVY。而这与烟草体内miRNA的变化直接相关,其中被TMV和ToMV侵染并

表现严重症状的烟草其miRNA明显增加,而受PVY侵染且症状表现不明显的烟草其miRNA变化也不明显(Bazzini et al., 2007)。而这些miRNA在转TMV-CP突变体烟草中的积累量也明显增高,说明这些miRNA的变化与TMV侵染引起的症状以及转基因出现的表型有着直接关系(Bazzini et al., 2007)。玉米粗缩病是由水稻黑条纹矮缩病毒(*Rice black-streaked dwarf virus*, RBSDV)侵染引起的,感染了该病毒的玉米体内多个miRNA的表达受到影响(Zhou et al., 2016)。此外,马铃薯纺锤形块茎类病毒(*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd)侵染番茄后,也会引起内源的miRNA——miR319含量降低,而miR319可作用于番茄叶片发育相关的基因(Diermann et al., 2010)。

病毒学家对病毒侵染引起寄主miRNA变化的产生机制也展开了研究。其中病毒自身编码的基因沉默抑制因子(viral suppressor of RNA silencing, VSR)是干扰植物miRNA代谢通路的重要因素(Sil-havy & Burgyan, 2004; Du et al., 2014; Csorba et al., 2015)。病毒编码VSR的主要作用是为了抑制siRNA介导的抗病毒通路来保护自身的基因组不被降解,因而VSR可以通过多种方式、多种途径作用于siRNA介导的抗病毒免疫通路。如有的VSR可以与dsRNA或者siRNA结合来抑制siRNA的产生,从而抑制基因沉默复合物的形成;有的VSR可以直接与AGO蛋白结合,从而阻止siRNA进入或者直接引起AGO蛋白降解,以此来降低寄主的抗病毒能力;还有一些VSR作用于基因沉默通路中的其它辅助因子,如干扰HEN1对siRNA的甲基化过程等(Csorba et al., 2015)。

虽然病毒miRNA与siRNA的产生方式不同,但作用方式有很多相似之处,如都需要DCL蛋白的切割,以及与AGO蛋白形成基因沉默复合物,3'端都需要HEN1进行甲基化才能稳定等(Pallas & Garcia, 2011)。因而VSR在抑制siRNA介导的抗病毒通路的同时也影响了寄主的miRNA代谢途径,也是病毒侵染引起寄主产生症状的重要因素(Du et al., 2014; Feng et al., 2014)。如来源于番茄丛矮病毒属的P19蛋白,该蛋白含有与小RNA互作的结构功能域,因而不仅可以与siRNA结合,还可以与miRNA结合,从而阻止基因沉默复合物的形成,抑制siRNA或者miRNA作用于目标基因(Lakatos et al., 2006)。此外,P19还可以直接通过诱导miR168的大量表达

来抑制AGO1蛋白的表达,使得寄主不能通过大量表达AGO1蛋白来防御病毒的侵染,因而间接影响了miRNA的代谢通路(Pumplin & Voinnet, 2013)。马铃薯Y病毒属的Hc-Pro(helper-component proteinase)也可以通过多种方式作用于siRNA介导的基因沉默通路,同时干扰miRNA的代谢途径,影响寄主基因的表达,一方面HC-Pro可以与HEN1结合,阻止HEN1的甲基化作用,不仅导致siRNA发生降解,也会极大地影响miRNA的稳定性;另一方面,HC-Pro可以与寄主体内基因沉默复合体的抑制因子互作,从而使该复合体失去活性,无法作用于靶基因(Silhavy & Burgyn, 2004)。黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)编码的2b蛋白不仅可以与siRNA和双链miRNA在体内和体外结合,还可以直接与AGO1蛋白的PAZ结构域和部分PIWI结构域互作,抑制AGO1蛋白的剪切活性,进而影响了miRNA对靶基因的进一步作用(Zhang et al., 2006; Csorba et al., 2015)。

病毒干扰miRNA代谢并导致症状的最好证明是在转CMV-2b基因的拟南芥上可以观察到类似病毒侵染的症状(Chapman et al., 2004; Chellappan et al., 2005)。深入研究发现,CMV-Fny侵染拟南芥所引起的叶片畸形症状主要是由于2b蛋白抑制了miR159的产生,导致miR159的靶基因MYB33和MYB65上调表达,从而引发畸形症状的产生;而拟南芥双突变体myb33/myb65重新接种CMV-Fny以后,叶片畸形症状减轻(Du et al., 2014),说明VSR干扰了与寄主生长发育相关的基因代谢途径。

3 siRNA参与病毒致病过程

3.1 病毒siRNA介导的病毒致病过程

基因沉默是植物重要的抗病毒免疫机制,而针对在抗病毒过程起着重要作用的病毒siRNA的特性研究也越来越深入。尤其是随着高通量测序技术的发展,以极低的测序成本可以高通量、高灵敏度、高分辨率的快速完成十万到数百万条小RNA的序列测定工作,加速了病毒siRNA与寄主靶基因相互作用的研究(Ma et al., 2015)。目前,越来越多的病毒siRNA序列利用该技术被测定出来(Hadidi et al., 2016)。进一步将siRNA测序结果与植物基因组进行比对分析,发现一些病毒siRNA与植物的基因具有同源性。如木尔坦棉花曲叶病毒(*Cotton leaf curl Multan virus*, CuMuV)侵染棉花所产生的siR-

NA可作用于大量的棉花基因,这些基因与生物及非生物胁迫息息相关(Wang et al., 2016);CMV的siRNA可作用于大量的烟草基因(Qiu et al., 2017)。深入研究证明病毒siRNA与AGO蛋白所形成的RISC复合体不仅可以作用于病毒的基因组,还会靶定互补的寄主mRNA,从而导致寄主mRNA发生降解,引起相关症状的产生(Qi et al., 2009; Wang et al., 2012)。

病毒siRNA引发寄主症状的产生最早报道于2011年,Shimura et al.(2011)和Smith et al.(2011)的研究结果表明烟草被CMV侵染后产生的黄化症状,主要是由于CMV的卫星RNA产生的siRNA与叶绿素合成基因CHLI的mRNA存在22 nt的互补区域,因而随着病毒siRNA的产生也会导致CHLI的mRNA降解,从而引起叶片的黄化症状;而该siRNA与拟南芥和番茄植株的CHLI的mRNA不存在互补区域,因而CMV不能在拟南芥和番茄植株上引发黄化症状。此外,水稻条纹病毒(*Rice streak virus*, RSV)在侵染过程中所产生的siRNA可作用于烟草转录起始因子eIF4A,从而引起eIF4A基因的下调并导致叶片的卷曲和植株矮化(Shi et al., 2016)。CGMMV是我国重要的检疫性有害生物,严重威胁葫芦科作物。研究发现,将深度测序所获得的CGMMV的siRNA数据与黄瓜的基因组进行同源分析,也发现其病毒的siRNA可以作用于寄主代谢通路中的多个基因(Li et al., 2016)。因而,病毒siRNA很有可能是病毒致病的一种重要方式,研究siRNA在病毒致病过程中的具体机制以减少该病毒对我国瓜类作物的危害具有重要意义。

3.2 病毒siRNA介导的类病毒致病过程

siRNA除了参与病毒侵染以外,在类病毒致病过程中也扮演着重要角色。类病毒是一类环状闭合的单链RNA分子,自身不编码任何蛋白,却能引发多种植物病害。因而类病毒的致病原因一直是研究的热点。如桃潜隐花叶类病毒(*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd)可引起桃树叶片的严重白化症状。研究发现该类病毒含有一段插入序列PC-sRNA8a和PC-sRNA8b所产生的siRNA,能够作用于叶绿体热激蛋白(chloroplastic heat-shock protein 90, cHSP90)的mRNA,导致cHSP90表达量降低,引起叶绿体的畸形以及寄主植株的症状(Navarro et al., 2012)。在检疫性类病毒PSTVd中也发现了类似机制,PSTVd的siRNA可以作用于番茄胼胝质合成酶

(callose synthase)的 mRNAs,而不能作用于该基因的种类病毒在侵染番茄后则不能引起相关症状(Adkar-Purushothama et al., 2015)。在其它 PSTVd-番茄互作体系中, PSTVd 的 siRNA 还可以作用于氯通道蛋白(chloride channel protein, CLC-b-like)基因以及核糖体蛋白 S3a(ribosomal protein S3a-like)基因,导致其 mRNA 降解,引起植株矮化与叶片畸形(Adkar-Purushothama et al., 2017)。综上所述,病毒或类病毒与寄主在长期的互作过程中,很有可能利用 siRNA 来沉默寄主基因,将 siRNA 变为其致病的有利武器。因此,深入研究病毒 siRNA 靶定寄主基因是否是普遍现象以及其相关作用机制将有利于开辟新的抗病毒研究领域以及途径。

4 展望

入侵植物病毒往往对我国本土植物存在较大的潜在威胁,急需获得抗病毒种质材料以及采取有效措施进行扑灭与清除。随着生物技术的快速发展,科研工作者可以获得越来越多的植物基因组信息,而高通量测序技术又使得 siRNA 测序工作以极低的成本迅速完成。到目前,利用该技术已经获得大量的病毒 siRNA 数据(Hadidi et al., 2016),而且与寄主植物的基因组具有同源性的报道相继出现(Shi et al., 2016; Wang et al., 2016; Adkar-Purushothama et al., 2017)。然而,病毒 siRNA 直接作用寄主基因并导致产生相关症状的报道较少。虽然病毒利用寄主产生的抗病毒 siRNA 反作用于寄主基因的具体机制仍不清楚,但研究病毒 siRNA 与植物基因组同源是否具有普遍性将为解析病毒与植物的互作机制开辟新的研究领域,也将为未来指导抗外来入侵病毒材料选育和制订高效防控措施提供理论基础。

由于 miRNA 与 siRNA 有很多相同的作用方式,导致病毒直接或间接干扰了 miRNA 的代谢途径,从而影响植物相关的生理生化过程。很多研究已经证明了病毒侵染影响了 miRNA 代谢通路的一些相关因子的功能(Csorba et al., 2015),而具体干扰了哪一个 miRNA 并导致产生相关症状的研究依然较少。此外,早期大量的研究结果表明,病毒侵染可引起寄主植物大量基因的上调或下调(Dardick, 2007; Babu et al., 2008; Shi et al., 2016),而基因表达的变化是否是病毒干扰 miRNA 的代谢引起尚不清楚。这很有可能是由于差异 miRNA 的筛选以及鉴定其靶基因的工作较为复杂导致。降解组测序技术是近期

出现的快速检测 miRNA 靶基因的新技术。此外,科研人员可以直接利用 miRBase 相关数据库等进行在线搜索已知 miRNA 的靶标信息。相信在科研技术的推动下,病毒侵染后 miRNA 的差异变化以及相应靶基因的鉴定工作会更加高效精准,病毒干扰 miRNA 代谢从而打破寄主代谢平衡的研究也会更加全面详实。

参考文献 (References)

- Adkar-Purushothama CR, Brosseau C, Giguere T, Sano T, Moffett P, Perreault JP. 2015. Small RNA derived from the virulence modulating region of the *Potato spindle tuber viroid* silences *callose synthase* genes of tomato plants. *Plant Cell*, 27(8): 2178–2194
- Adkar-Purushothama CR, Iyer PS, Perreault JP. 2017. *Potato spindle tuber viroid* infection triggers degradation of chloride channel protein CLC-b-like and ribosomal protein S3a-like mRNAs in tomato plants. *Scientific Reports*, 7(1): 8341
- Babu M, Gagarinova AG, Brandle JE, Wang AM. 2008. Association of the transcriptional response of soybean plants with *Soybean mosaic virus* systemic infection. *Journal of General Virology*, 89(4): 1069–1080
- Baldrich P, San Segundo B. 2016. MicroRNAs in rice innate immunity. *Rice*, 9(1): 6
- Bazzini AA, Hopp HE, Beachy RN, Asurmendi S. 2007. Infection and coaccumulation of *Tobacco mosaic virus* proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, 104(29): 12157–12162
- Borges F, Martienssen RA. 2015. The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(12): 727–741
- Caplan JL, Mamillapalli P, Burch-Smith TM, Czymmek K, Dinesh-Kumar SP. 2008. Chloroplastic protein NRIP1 mediates innate immune receptor recognition of a viral effector. *Cell*, 132(3): 449–462
- Chapman EJ, Prokhnovsky AI, Gopinath K, Dolja VV, Carrington JC. 2004. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes & Development*, 18(10): 1179–1186
- Chellappan P, Vanitharani R, Fauquet CM. 2005. MicroRNA-binding viral protein interferes with *Arabidopsis* development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(29): 10381–10386
- Coll NS, Eppele P, Dangl JL. 2011. Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death and Differentiation*, 18(8): 1247–1256
- Csorba T, Kontra L, Burgyan J. 2015. Viral silencing suppressors: tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology*, 479/480: 85–103

- Dardick C. 2007. Comparative expression profiling of *Nicotiana benthamiana* leaves systemically infected with three fruit tree viruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(8): 1004–1017
- Diermann N, Matousek J, Junge M, Riesner D, Steger G. 2010. Characterization of plant miRNAs and small RNAs derived from *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) in infected tomato. *Biological Chemistry*, 391(12): 1379–1390
- Ding SW. 2010. RNA-based antiviral immunity. *Nature Reviews Immunology*, 10(9): 632–644
- Du ZY, Chen AZ, Chen WH, Westwood JH, Baulcombe DC, Carr JP. 2014. Using a viral vector to reveal the role of microRNA159 in disease symptom induction by a severe strain of *Cucumber mosaic virus*. *Plant Physiology*, 164(3): 1378–1388
- Feng JL, Liu SS, Wang MN, Lang QL, Jin CZ. 2014. Identification of microRNAs and their targets in tomato infected with *Cucumber mosaic virus* based on deep sequencing. *Planta*, 240(6): 1335–1352
- Finnegan EF, Pasquinelli AE. 2013. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 48(1): 51–68
- 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(6669): 806–811
- German MA, Pillay M, Jeong DH, Hetawal A, Luo S, Janardhanan P, Kannan V, Rymarquis LA, Nobuta K, German R, et al. 2008. Global identification of microRNA-target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends. *Nature Biotechnology*, 26(8): 941–946
- Guo YS, Jia MA, Yang YM, Zhan LL, Cheng XF, Cai JY, Zhang J, Yang J, Liu T, Fu Q, et al. 2017. Integrated analysis of tobacco miRNA and mRNA expression profiles under PVY infection provides insight into tobacco-PVY interactions. *Scientific Reports*, 7(1): 4895
- Hadidi A, Flores R, Candresse T, Barba M. 2016. Next-generation sequencing and genome editing in plant virology. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1325
- Islam W, Islam SU, Qasim M, Wang LD. 2017. Host-pathogen interactions modulated by small RNAs. *RNA Biology*, 14(7): 891–904
- Jones JDG, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444(7117): 323–329
- Khraiwesh B, Zhu JK, Zhu J. 2012. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819(2): 137–148
- Kumar R. 2014. Role of microRNAs in biotic and abiotic stress responses in crop plants. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(1): 93–115
- Lakatos L, Csorba T, Pantaleo V, Chapman EJ, Carrington JC, Liu YP, Dolja VV, Calvino LF, Lopez-Moya JJ, Burguán J. 2006. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *The EMBO Journal*, 25(12): 2768–2780
- Lee R, Feinbaum R, Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5): 843–854
- Li F, Pignatta D, Bendix C, Brunkard JO, Cohn MM, Tung J, Sun H, Kumar P, Baker B. 2012. MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, 109(5): 1790–1795
- Li Y, Zhang QQ, Zhang JG, Wu L, Qi YJ, Zhou JM. 2010b. Identification of microRNAs involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered plant innate immunity. *Plant Physiology*, 152(4): 2222–2231
- Li YF, Zheng Y, Addo-Quaye C, Zhang L, Saini A, Jagadeeswaran G, Axtell MJ, Zhang W, Sunkar R. 2010a. Transcriptome-wide identification of microRNA targets in rice. *The Plant Journal*, 62(5): 742–759
- Li YQ, Deng CL, Shang QX, Zhao XL, Liu XL, Zhou Q. 2016. Characterization of siRNAs derived from *Cucumber green mottle mosaic virus* in infected cucumber plants. *Archives of Virology*, 161(2): 455–458
- Liu SR, Zhou JJ, Hu CG, Wei C, Zhang JZ. 2017. MicroRNA-mediated gene silencing in plant defense and viral counter-defense. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1801
- Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. 2002. Cleavage of scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science*, 297(5589): 2053–2056
- Mandadi KK, Scholthof K-BG. 2013. Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? *Plant Cell*, 25(5): 1489–1505
- Ma XX, Tang ZH, Qin JP, Meng YJ. 2015. The use of high-throughput sequencing methods for plant microRNA research. *RNA Biology*, 12(7): 709–719
- Mao W, Li Z, Xia X, Li Y, Yu J. 2012. A combined approach of high-throughput sequencing and degradome analysis reveals tissue specific expression of microRNAs and their targets in cucumber. *PLoS ONE*, 7(3): e33040
- Moon JY, Park JM. 2016. Cross-talk in viral defense signaling in plants. *Frontiers in Microbiology*, 7: 2068
- Muthamilarasan M, Prasad M. 2013. Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. *Journal of Biosciences*, 38(2): 433–449
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell*, 2(4): 279–289
- Navarro B, Gisel A, Rodio ME, Delgado S, Flores R, di Serio F. 2012. Small RNAs containing the pathogenic determinant of a chloroplast-replicating viroid guide the degradation of a host mRNA as predicted by RNA silencing. *The Plant Journal*, 70(6): 991–1003
- Pallas V, Garcia JA. 2011. How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *Journal of General Virology*, 92(P12): 2691–2705
- Park JH, Shin C. 2015. The role of plant small RNAs in NB-LRR regu-

- lation. Briefings in Functional Genomics, 14(4): 268–274
- Pumplin N, Voinnet O. 2013. RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. Nature Reviews Microbiology, 11(11): 745–760
- Qi X, Bao FS, Xie Z. 2009. Small RNA deep sequencing reveals role for *Arabidopsis thaliana* RNA-dependent RNA polymerases in viral siRNA biogenesis. PLoS ONE, 4(3): e4971
- Qiu Y, Zhang Y, Hu F, Zhu S. 2017. Characterization of siRNAs derived from *Cucumber mosaic virus* in infected tobacco plants. Archives of Virology, 162(7): 2077–2082
- Ramirez-Prado JS, Abulfaraj AA, Rayapuram N, Benhamed M, Hirt H. 2018. Plant immunity: from signaling to epigenetic control of defense. Trends in Plant Science, 23(9): 833–844
- Reinhart B, Slack F, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 403(6772): 901–906
- Rosa C, Kuo YW, Wuriyanghan H, Falk BW. 2018. RNA interference mechanisms and applications in plant pathology. Annual Review of Phytopathology, 56: 581–610
- Shi B, Lin L, Wang S, Guo Q, Zhou H, Rong L, Li J, Peng J, Lu Y, Zheng H, et al. 2016. Identification and regulation of host genes related to *Rice stripe virus* symptom production. The New Phytologist, 209(3): 1106–1119
- Shimura H, Pantaleo V, Ishihara T, Myojo N, Inaba J, Sueda K, Burgyan J, Masuta C. 2011. A viral satellite RNA induces yellow symptoms on tobacco by targeting a gene involved in chlorophyll biosynthesis using the RNA silencing machinery. PLoS Pathogens, 7(5): e1002021
- Silhavy D, Burgyan J. 2004. Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. Trends in Plant Science, 9(2): 76–83
- Smith NA, Eamens AL, Wang MB. 2011. Viral small interfering RNAs target host genes to mediate disease symptoms in plants. PLoS Pathogens, 7(5): e1002022
- Sun YY, Niu XW, Fan M. 2017. Genome-wide identification of *Cucumber green mottle mosaic virus*-responsive microRNAs in watermelon. Archives of Virology, 162(9): 2591–2602
- Sun ZT, He YQ, Li JM, Wang X, Chen JP. 2015. Genome-wide characterization of *Rice black streaked dwarf virus*-responsive microRNAs in rice leaves and roots by small RNA and degradome sequencing. Plant and Cell Physiology, 56(4): 688–699
- Tijsterman M, Ketting RF, Plasterk RHA. 2002. The genetics of RNA silencing. Annual Review of Genetics, 36: 489–519
- Tong AZ, Yuan Q, Wang S, Peng JJ, Lu YW, Zheng HY, Lin L, Chen HR, Gong YF, Chen JP, et al. 2017. Altered accumulation of osa-miR171b contributes to *Rice stripe virus* infection by regulating disease symptoms. Journal of Experimental Botany, 68(15): 4357–4367
- Wang JY, Tang YF, Yang YW, Ma N, Ling XT, Kan JL, He ZF, Zhang BL. 2016. *Cotton leaf curl multan virus*-derived viral small RNAs can target cotton genes to promote viral infection. Frontiers in Plant Science, 7: 1162
- Wang MB, Masuta C, Smith NA, Shimura H. 2012. RNA silencing and plant viral diseases. Molecular Plant-Microbe Interactions, 25(10): 1275–1285
- Xia ZH, Zhao ZX, Li MJ, Chen L, Jiao ZY, Wu YH, Zhou T, Yu WC, Fan ZF. 2018. Identification of miRNAs and their targets in maize in response to *Sugarcane mosaic virus* infection. Plant Physiology and Biochemistry, 125: 143–152
- Zhang XR, Yuan YR, Pei Y, Lin SS, Tuschl T, Patel DJ, Chua NH. 2006. *Cucumber mosaic virus*-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. Genes & Development, 20(23): 3255–3268
- Zhou Y, Xu ZN, Duan CX, Chen YP, Meng QC, Wu JR, Hao ZF, Wang ZH, Li MS, Yong HJ, et al. 2016. Dual transcriptome analysis reveals insights into the response to *Rice black-streaked dwarf virus* in maize. Journal of Experimental Botany, 67(15): 4593–4609

(责任编辑:李美娟)