

番茄真核翻译起始因子 4E 基因 RNA 干涉及其抗病毒特性研究^{*}

张余洋^{1,2} 漆梅芳^{2,3} 叶志彪^{1,2} 李汉霞^{2,3, **}

华中农业大学 1. 作物遗传改良国家重点实验室; 2. 国家蔬菜改良中心华中分中心;
3. 园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070

摘要 植物真核翻译起始因子 4E (eIF4E) 在蛋白质翻译过程中发挥重要作用. 最近研究表明 eIF4E 在参与植物病毒互作, 影响病毒在寄主中复制和侵染过程. 文中通过 RNA 干涉调控番茄 *eIF4E* 表达, 鉴定 *eIF4E* 在植物病毒互作中的作用. 根据数据库假设性一致序列 (TC171564, TC170275) 分别克隆了番茄“中蔬五号” *SleIF4E* 基因及其异构体基因 *SleIF(iso)4E*. 构建了 *SleIF4E* RNAi 抑制表达载体 pSL4D, 通过农杆菌介导的方法导入番茄品种“中蔬五号”基因组. PCR 检测和 Southern blot 结果表明, 目标基因已整合到番茄基因组中. 通过半定量 RT-PCR 对转基因番茄进行 *eIF4E* 表达分析, 表明 pSL4D 转化番茄中 *eIF4E* 得到不同程度抑制. 转基因植株分别接种 PVY 和 CMV 两种病毒, 病毒 ELISA 测定和病毒 RNA 积累量分析表明, pSL4D 转化植株相对于对照组均获得不同程度的病毒抗性, 番茄 *eIF4E* 参与 PVY 的复制或侵染寄主过程. 就不同病毒而言, RNAi 对 PVY 抗性的调控效果比 CMV 调控效果好, 抑制 *eIF4E* 表达可提高植物对 PVY 的抗性.

关键词 真核翻译起始因子 4E 病毒抗性 番茄

应用来源于病毒本身的基因转化植物来获得抗病毒的方法 (pathogen-derived resistance, PDR), 已经取得重要的研究进展^[1-7]. 然而, 利用植物自身来源基因开展植物抗病毒研究具有更好的生物安全性^[8]. 番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) 等重要蔬菜作物受多种病毒危害, 包括有烟草花叶病毒 (TMV), 黄瓜花叶病毒 (CMV), 马铃薯 Y 病毒 (PVY)、马铃薯 X 病毒 (PVX)、苜蓿花叶病毒 (AMV) 和烟草蚀纹病毒 (TEV) 等^[9]. 目前植物抗病毒基因工程主要采用转病毒外壳蛋白基因 (CP)^[1-4], 复制酶基因 (*Rep*)^[5, 6]、运动蛋白基因 (*MP*)^[5, 6] 以及病毒卫星 RNA^[10] 等方法. 其中以转 CP 基因最早, 取得的成果最多^[1-4, 7]. 这些病毒来

源的抗性基因往往通过转录后基因沉默 (PTGS) 途径实现的^[11]. 随着分子生物学技术的迅速发展, 利用非病毒来源的基因, 采用寄主植物自身因子的表达调控, 从多个途径封闭病毒基因组的功能表达, 从而有效地阻断病毒的复制与传播途径, 获得广谱病毒抗性, 已成为当前的发展趋势.

研究表明真核翻译起始因子 4E (Eukaryotic translation initiation factor 4E, eIF4E) 在植物与病毒互作中发挥极其关键的作用^[12]. 先后在拟南芥^[13, 14]、辣椒^[15, 16]、莴苣^[17] 的隐性抗病突变体中, 发现其 *eIF4E* 基因序列的突变可增强植物对病毒的抗性, 特别是对马铃薯 Y 病毒属 (*Potyvirus*) 病毒的抗性. 同样, eIF(iso)4E (eIF4E 的异构体) 也参

2007-08-25 收稿, 2007-11-06 收修改稿

^{*} 国家自然科学基金 (批准号: 30671417) 和华中农业大学博士科研基金 (批准号: 52204-07037) 资助项目

^{**} 通信作者, E-mail: hxli@mail.hzau.edu.cn

©1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

与植物与马铃薯 Y 病毒属病毒的互作^[13, 16]。马铃薯 Y 病毒属病毒基因组 5' 端的病毒基因组蛋白(viral protein linked to the genome, VPg)在病毒与寄主植物互作中发挥重要的作用^[18]。实验表明植物中 eIF4E 具有 VPg 结合的能力, 促进其在寄主中复制与侵染^[19-22]。干扰 eIF4E 与 VPg 之间的互作, 则可增强植物的抗病毒能力。在番茄中正义表达辣椒突变型 *eIF4E* 同样提高植物的病毒抗性^[23]。表明辣椒突变 *eIF4E* 在番茄中异位表达同样能够干扰病毒 RNA 的复制和侵染。由此推出另外一个问题, 对番茄自身的 *eIF4E* 干扰, 进行功能敲除, 理论上也应该影响着病毒的生命周期。对 *eIF4E* 干扰进行抗病毒研究尚未见报道。而拟南芥 *eIF4E* 突变体植株自身生长发育并没有受到影响^[13]。这为本实验拟通过抑制野生型 *eIF4E* 基因表达提高植物抗病毒性奠定了坚实的理论基础。通过 RNA 干扰抑制翻译起始因子 4E 编码基因, 提高番茄抗病毒能力, 为研究 *eIF4E* 在病毒抗性中的作用提供直接证据。鉴于该类基因在植物体中具有存在广泛性和植物自身来源基因的生物安全性, 因此具有重要的研究价值。

1 材料与与方法

1.1 实验材料

1.1.1 植物材料 植物材料为番茄商业品种中蔬五号(ZS5), 购自中国农业科学院蔬菜花卉研究所。

1.1.2 细菌和病毒材料 大肠杆菌菌株 DH5 α 、农杆菌菌株 LBA4404、植物干扰载体 pHellsgate2 均为本实验室保存。马铃薯 Y 病毒普通株系(Potato virus Y, common strain, PVY⁰)由华中农业大学马铃薯课题组谢从华教授提供, 活体繁殖保存于试管烟草中。黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)由东北农业大学李景富教授提供, 活体保存于番茄。

1.1.3 试剂材料 *Taq* DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶、限制性内切酶来自 Fermentas 公司; Trizol Reagent 购于 Invitrogen 公司; 反转录酶购自武汉博尔公司; DNA 纯化回收试剂盒购于上海申友公

司; pMD18-T 载体购自大连宝生物; Hybond-N⁺ 尼龙膜为 Amersham 公司产品; [α -³²P]-dCTP 购自北京福瑞公司; 引物和其他相关试剂购自上海生物工程公司。DAS-ELISA (PVY 和 CMV) 使用美国 Agdia 公司的植物病原检测试剂盒。

1.2 实验方法

1.2.1 番茄真核翻译起始因子 4E 基因克隆 以番茄常规品种“中蔬五号”为材料, 用 Trizol 提取嫩叶组织 RNA, 利用 RT-PCR 反应试剂盒制备 cDNA (ReverTraAce RT-PCR kit, Toyobo, Japan)。反转录实验方法参照该试剂盒使用说明。在 GenBank 和 TIGR 数据库(<http://www.tigr.org/>)中寻求番茄翻译起始因子 4E 相关基因及其异构体编码基因。按 Primer 3.0 (<http://redb.ncpgr.cn/modules/redbtools/primer3.php>)设计引物, 以 cDNA 为模板, 扩增基因编码区。反应参数: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 4 min。扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离, 回收、纯化并克隆至 pMD18-T 载体, 进行序列测定。以 BLAST、ClustalW 和 BoxShade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)等软件进行序列分析。

1.2.2 载体构建 根据克隆得到番茄中蔬五号真核翻译起始因子 4E 基因序列 (GenBank 注册号: DQ537341)设计两轮 PCR 引物, 通过两步法和 BP 反应构建 RNAi 载体。所选用的干涉片段的位置在基因中部的区域(163-529 位)。第一轮引物为: 12attB1-SL4Fw: 5'-AAAAAGCAGGCT AAGCA-TCCATTGGAGCA TTC-3'; 12attB2-SL4Rv: 5'-AGAAAGCTGGGT CCTTAGCCCGGACACTAA-CA-3'。方框区域分别与第二轮引物 attB1 和 attB2 的 3'-末端 12 碱基匹配。第二轮通用引物分别为:

attB1: 5'-GGGGACAACTTTGTACA AAAAAGCAGGCT-3';
attB2: 5'-GGGGACCACTTTGTACA AGAAAGCTGGGT-3'。

以番茄中蔬五号提取总 RNA 反转录 cDNA 为模板, 以第一轮两条引物进行第一轮 PCR, 以该 PCR 产物为模板进行第二轮 PCR。第二轮 PCR 产物纯化

后与干涉载体 pHellsgate2 进行 BP 反应, 反应体系和条件按 Gateway² BP ClonaseTM Enzyme Mix 试剂盒 (Invitrogen) 进行. BP 反应产物先转化至 DH5 α 大肠杆菌, 再提取质粒进行基因序列验证, 构建成番茄真核翻译起始因子基因的干涉表达载体.

1.2.3 番茄遗传转化 番茄的遗传转化操作参考文献[24] 进行.

1.2.4 转化植株 PCR 检测 为了证实 T₀ 代番茄转化植株基因组中是否有 *eIF4E* 的基因干涉片段插入, 按照常规 CTAB 法提取转基因植株的番茄叶片总 DNA, 以未转化植株的 DNA 作阴性对照. 由于 *eIF4E* 为番茄内源基因, 基因两侧载体部分序列设计 PCR 引物. 以 pHellsgate2 CaM35S 引物 (5'-ACGCACAATCCCCTACTCCTTC-3') 与 *Pdk* intron 序列特异引物 (5'-CTTTTATCTTCTTCGTCTTACAC-3') 对转基因植株进行 PCR 检测分析.

1.2.5 Southern blot 分析 取 15 μ g 基因组 DNA, 用限制性内切酶 *EcoRV* 完全酶切, 酶切产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离, 转膜后用同位素³²P-dCTP 标记的 *np111* 基因片段作探针杂交. 转膜及杂交方法见文献[25].

1.2.6 转基因植株 RT-PCR 检测 按 1.2.1 部分的方法获得转基因植株的 cDNA. 取相同含量的 cDNA, 利用引物 (S14-Fw: 5'-ATGGCAGCAGCTGAAATGG-3', S14-Rv: 5'-CTATACGGTGTAACGATTCTTGGC-3') 对干涉载体 pSL4D 转化番茄植株进行 RT-PCR 分析. 利用番茄 β -actin 基因作内标校准 cDNA 浓度. β -actin 基因 PCR 引物分别为 ACT-Fw: 5'-ATGGCAGACGGAGAGGATATTCA-3', ACT-Rv: 5'-GCCTTTGCAATCCAATCTGCTG-3'.

1.2.7 转化植株病毒抗性分析 采用汁液摩擦接种方法进行病毒接种. 接种缓冲液为 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) (NaCl 8.0 g; KCl 0.2 g; Na₂HPO₄ 1.44 g; KH₂PO₄ 0.24 g; 加 ddH₂O 至 1000 mL). 分别取带有马铃薯 Y 病毒的烟草叶片和带黄瓜花叶病毒的番茄叶片 1g, 加 6mL 接种缓冲液于研钵中进行研磨成匀浆, 缓冲液中加入少许石英砂. 在防虫、控

温的负压温室中, 对长势、大小基本一致的 5—6 叶龄番茄进行接种. 接种后植株放在 22—25 $^{\circ}$ C 的隔离温室中培养. 每株接种 3 片小叶, 用未转化番茄 (中蔬 5 号) 作对照. 接种后逐日观察接种的植株发病症状的发展. 病毒接种 30 d 后, 用 ELISA 法检测转基因番茄中病毒的含量, 检测方法参照试剂盒推荐进行 (Aglia 公司).

1.2.8 转基因植株中病毒 RNA 积累分析 通过半定量 RT-PCR 和 Northern blot 分析转基因番茄中病毒 RNA 的积累量. 提取接种病毒 30 d 后的番茄新叶片总 RNA. 分别根据所接种的病毒 CMV 和 PVY 外壳蛋白编码基因序列设计 RT-PCR 引物. 两组引物分别为 CMVCP-Fw: 5'-AGACGTTAGCAGCTGGTCTG-3', CMVCP-Rv: 5'-GTGGGAATACGT-TGGTGCTC-3', 预期扩增产物片段大小为 657 bp; PVYCP-Fw: 5'-AAATGAGAAATGCCCAAAGC-3', PVYCP-Rv: 5'-AGGTTGGGCTGATTTCAA-TG-3', 预期扩增片段大小为 533 bp. RT-PCR 参照本文 1.2.1 部分所述方法, 以番茄看家基因 β -actin 为内标对照.

各取 20 μ g 转基因番茄和非转基因番茄 RNA, 进行 10% 甲醛变性和 1.2% 琼脂糖电泳分离后, 经 20 \times SSC 转移到 HybondTM-N⁺ 尼龙膜. 80 $^{\circ}$ C 固定 2h 后与探针 (分别为同位素标记的 PVY 和 CMV 外壳蛋白基因) 杂交.

2 结果与分析

2.1 番茄真核翻译起始因子 4E 基因克隆

在 TIGR (<http://www.tigr.org/>) 中, 发现两条与 *eIF4E* 序列同源性较高的相关 TC (TC171564、TC170275). BLAST 分析表明, 其中 TC171564 为编码番茄 *eIF4E*, TC170275 编码番茄 *eIF(iso)4E* 基因. 分别设计引物进行扩增. 两个 TC 的 PCR 引物对分别为 TC171564-Fw: 5'-ATGGCAGCAGCTGAAATGG-3', TC171564-Rv: 5'-CTATACGGTGTAACGATTCTTGGC-3'; TC170275-Fw: 5'-GTGAAAAGCTATACAAAAGGAGAG-3', TC170275-Rv: 5'-CAATACATCCAAACATACATCAAGT-3'. 以番茄品种“中蔬 5 号”总 RNA 反转录 cDNA 为模板, 进行 RT-PCR, 扩增出 *eIF4E* 和 *eIF(iso)4E* cDNA.

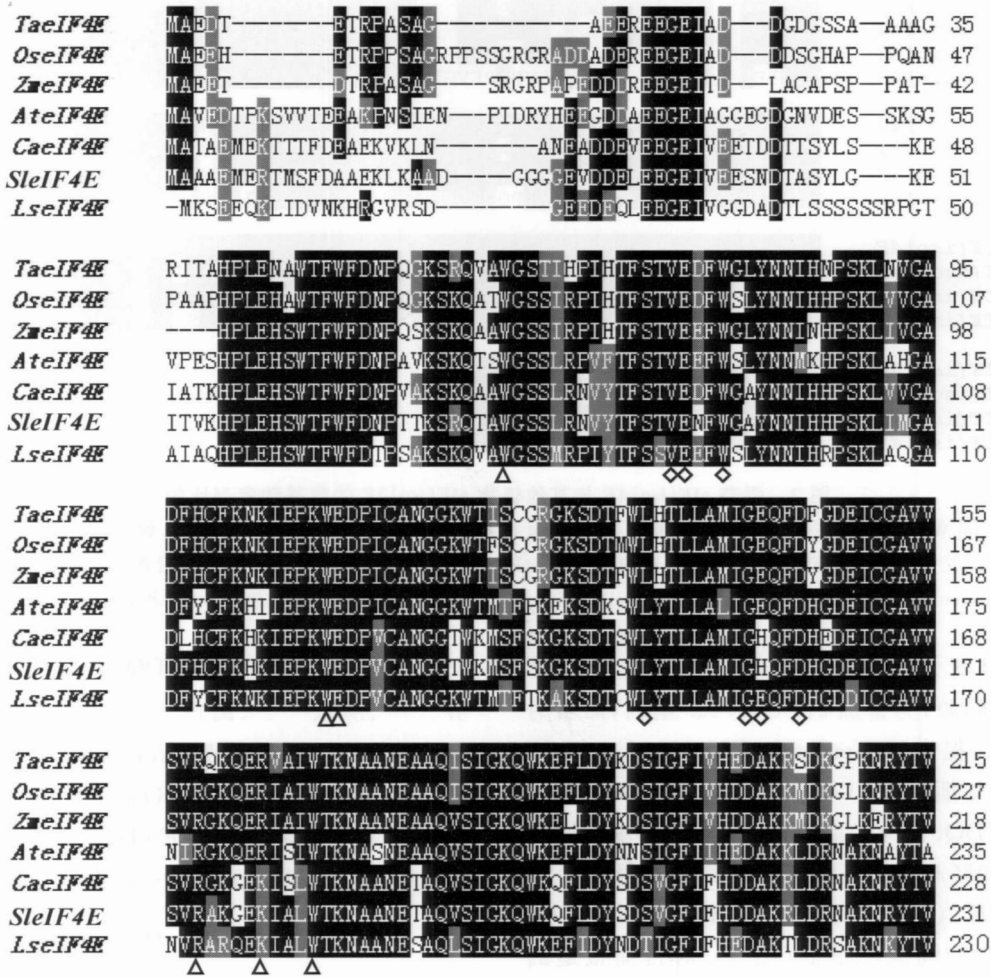


图 1 番茄 eIF4E 与其他植物 eIF4E 的氨基酸同源序列比较

以 Clustal W 对 7 种 eIF4E 氨基酸序列包括小麦(*TaeIF4E*, CAA78262)、水稻(*OseIF4E*, AAB40348)、玉米(*ZmeIF4E*, AAC27714)、拟南芥(*AteIF4E*, CAA71580)、辣椒(*CaeIF4E*, AAM82190)、番茄(*SleIF4E*, ABF83562)和莴苣(*LseIF4E*, AAP86602)进行多序列比对, 然后在 BoxShade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_fom.html)中标注, 黑色阴影表示相同氨基酸, 灰色阴影表示相似氨基酸, 域值为 0.5. 三角形(△)所示区域表示 eIF4E 在蛋白质翻译起始过程中与 eIF4G 结合位点, 菱形(◇)所示区域表示 eIF4E 在蛋白质翻译起始过程中与 mRNA 帽子结构结合位点^[2]

扩增产物克隆至 PMD18-T 载体中并进行序列测定, 结果表明克隆片段与 GenBank 数据库 *eIF4E* 序列高度同源, 高达 99%, 确认为番茄 *eIF4E* 基因. 根据前人的报道, 真核翻译起始因子 4E 编码基因的碱基突变可能意味着产生对病毒的抗性. 从“中蔬五号”品种番茄中获得的 *eIF4E* cDNA 挑出 6 个克隆进行序列分析. 所得到的番茄核翻译起始因子 4E 基因序列 cDNA 全长为 696 bp, 编码 231 个

氨基酸. 由于真核翻译起始因子 4E 的隐性突变对于植物的抗病毒特性具有较大影响, 且中蔬五号番茄品种对 TMV 和番茄花叶病毒 (tomato mosaic virus, ToMV) 具有一定的抗性, 将所克隆基因序列提交至 GenBank 中 (DQ537341), 命名为 *SleIF4E*. *SleIF4E* 和辣椒 *eIF4E* (AY485129) 88% 同源, 与水稻 *eIF4E* (AM411441) 79% 同源 (图 1).



图 2 番茄 *eIF(iso)4E* 与其他植物 *eIF(iso)4E* 的氨基酸序列比较

以 Clustal W 对 4 种 *eIF(iso)4E* 氨基酸序列序列包括番茄 (*SleIF(iso)4E*, EU119958)、烟草 (*NteIF(iso)4E*, AAU06579)、辣椒 (*CaeIF(iso)4E*, AA Y62609) 和豌豆 (*PseIF(iso)4E*, ABH09880) 进行多序列比对, 然后在 BoxShade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) 中标注. 黑色阴影表示相同氨基酸, 灰色阴影表示相似氨基酸, 域值为 0.5

所克隆得到另外一个基因经序列分析, 与 *eIF(iso)4E* 高度同源, 为番茄 *eIF(iso)4E* 基因, 命名为 *SleIF(iso)4E*, 提交至 GenBank (EU119958). *SleIF(iso)4E* 序列与烟草 *eIF(iso)4E* (A Y699609)、辣椒 *eIF(iso)4E* (DQ022084) 高度同源, 核苷酸水平同源性分别达到 99% 和 91% (图 2). 而番茄自身两个异构体 *SleIF4E* (DQ537341) 与 *SleIF(iso)4E* (EU119958) 之间同源性很低 (图 3). 对目前报道的植物中的 *eIF4E* 和 *eIF(iso)4E* 氨基酸进行进化分析, 可知所有 *eIF(iso)4E* 进化关系聚在一大类, 其中番茄、烟草和辣椒等茄科基因同源性 90% 左右. *eIF4E* 进化关系较近, 其中茄科聚在一起, 禾本科聚在一起, 表现出同源性 (图 3).



图 3 植物中 11 种 *eIF4E* 和 *eIF(iso)4E* 进化关系

11 种氨基酸序列编号分别对应于图 2 和图 4 中基因的氨基酸序列; 基因名称后百分率表示该序列与番茄 *SleIF(iso)4E* 在氨基酸水平的相同度

由于与 *SleIF4E* (DQ537341) 同源的拟南芥^[13, 14]、辣椒^[15, 16]、莴苣^[17]等物种中均为 *eIF4E* 参与病毒抗性, 而与番茄 *SleIF(iso)4E* 同源的辣椒、烟草等物种均未发现 *eIF(iso)4E* 参与病毒抗性. 因此, 本实验拟对 *SleIF4E* (DQ537341) 进一步通过 RNAi 研究该基因在植物-病毒互作中的作用.

2.2 真核翻译起始因子 4E 干扰载体构建

通过两步 PCR 法将完整的 attB1/attB2 序列分别加至 *eIF4E* 中部一段 367 bp 序列两侧. 带有 attB1/attB2 位点的目的基因片段, 在 BP Clonase 作用下, 与载体 pHellsgate2 上的 attP1/attP2 位点发生重组, 将目的基因片段整合到 pHellsgate2 上, 最终形成携带有 *SleIF4E* 基因反向重复片段的植物表达载体 pSL4D (图 4). 通过电激法将 pSL4D 导入农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 中, 用于番茄遗传转化.



图 4 干扰载体 pSL4D 的 T-DNA 结构示意图

RB, 左边界; LB, 右边界; *eIF4E*, *eIF4E* 基因干涉片段 (不同方框箭头方向表示不同插入方向); P35S, 花椰菜花叶病毒 35S 启动子; intron, *Pdk* 基因内含子; Tnos, 胭脂碱合酶终止子; KAN, 卡那霉素抗性区域包括启动子和终止子; attR1 attR2, attB attP 位点重组反应产物; 黑色箭头表示 PCR 检测引物结合位置和延伸方向

2.3 基因转化植株的 PCR 检测

通过农杆菌介导的遗传转化方法以 pSL4D 进行番茄遗传转化, 并获得 7 株卡那霉素抗性植株。

以未转化植株为阴性对照, 利用 CaMV35S 引物和 *Pdk* intron 引物对番茄转化植株进行 PCR 检测 (图 5)。由于这两条引物结合位点分别在干涉片段的两测, 扩增片段应比 *SleIF4E* 原始干涉片段其长度 (367 bp) 长 200 bp 左右, 扩增产物片段大约为 550 bp 左右。经 1.0% 琼脂糖凝胶检测, 发现转化番茄植株都能扩增出预期大小的电泳带, 而在未转化对照中则未出现该特异带, 初步证实外源基因整合到这些番茄植株的基因组中 (图 5)。

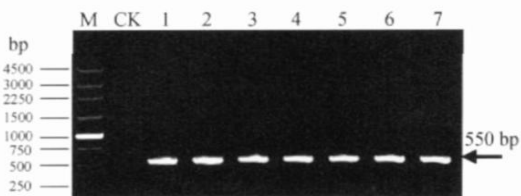


图 5 pSL4D 转化番茄植株的 PCR 检测

M, 250 bp DNA 分子量标准; CK, 非转基因对照; 1—7, 转基因植株

2.4 转化植株的 Southern 杂交检测

在转化植株的 Southern 杂交分析中, 为真实地证实基因整合以及基因的插入位点数, 需要选用合适的限制性内切酶。实验对构建的植物表达载体 T-DNA 区段的酶切位点进行分析, 选定限制性内切酶 *EcoRV* 酶切基因转化植株 DNA, 经毛细管法转移至尼龙膜, 以 *nptII* 标记基因作为探针进行分子杂交检测。图 6 为 pSL4D 转化植株的 Southern 杂交结果, 结果显示 PCR 检测的阳性植株中, 目标基因已经整合到基因组中, 且多数为多拷贝插入。

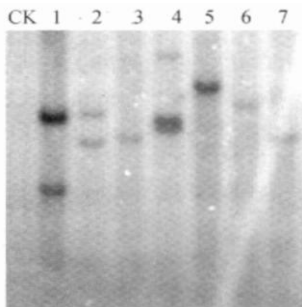


图 6 pSL4D 转化植株的 Southern 杂交分析

CK, 非转基因对照; 1—7, 转基因植株

2.5 RNAi 对内源基因表达的影响

要研究基因干涉对植物内源基因的影响, 利用半定量 RT-PCR 研究内源基因的转录水平与对照相比的差异。小量法提取转基因植株总 RNA, 进行 RT-PCR 分析。

以 *SleIF4E* 特异引物 (S14-Fw: 5'-ATGGCAG-CAGCTGAAATGG-3', S14-Rv: 5'-CTATACGGT-GTAACGATTCTTGGC-3') 对干涉载体 (pSL4D) 转化番茄植株进行 RT-PCR 分析。分析表明, 与对照相比, 基因转化番茄株系中 *eIF4E* 在转录水平受到明显抑制, 个别株系效果非常显著, 很难检测出其 *eIF4E* 转录水平 (图 7)。

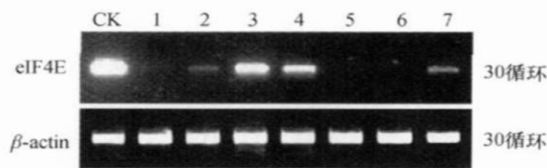


图 7 番茄 *eIF4E* 干涉载体转化对番茄内源基因的影响

CK, 非转基因对照; 1—7, 转基因植株

2.6 *SleIF4E* 干涉对番茄植株病毒抗性的影响

为了能在转化株系中并列接种 PVY 和 CMV, 先对获得的 7 个转基因株系进行无性扩繁, 在来自于同一株系的繁殖材料中平行接种 PVY 和 CMV。

接种 PVY 结果表明, 基因转化植株相对于未转化对照而言表现出了不同程度的对 PVY 病毒的抗性 (没有出现症状)、耐性 (延迟出现症状) 和易感性 (较早出现症状)。接种 4 d 后, 3 株对照番茄 (中蔬五号) 植株出现明脉、花叶和皱缩的马铃薯 Y 病毒病状。一个月后, 新长出的叶片同样表现出花叶, 皱缩病症。在 *eIF4E* 干涉载体转化番茄中有 2 株 (29%) 与对照相当, 较早表现出花叶症状, 然而在接种 30 d 后新叶并没有明显的花叶症状。2 株 (29%) 在接种 10 d 后有轻微的症状, 表现出延迟出现症状, 在后期长出的新叶上也没有表现出病症。另外 3 株 (43%) 一直没有发病症状, 表现出抗马铃薯 Y 病毒的能力 (图 8)。

接种 CMV 的植株中, 3 株对照番茄在接种病毒后第 3 天表现出明显花叶、皱缩、枯斑病状。在 *eIF4E* 干涉载体转化植株中, 1 株 (14%) 与对照相当, 早期表现出明显的感病症状, 30 d 后新叶也表现出明显的花

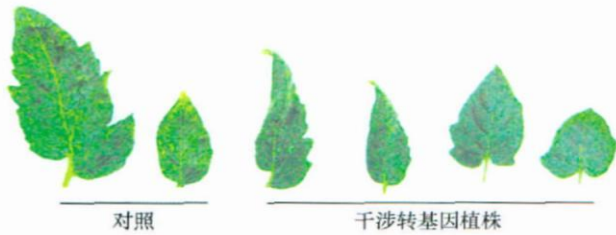


图 8 *SteIF4E* 干涉载体转化植株(株系 1) 接种 PVY 后的症状表现

叶、皱缩症状. 5 株(71%) 接种后 3 d 表现轻微症状, 枯斑面积, 皱缩程度都轻于对照植株, 30 d 后新叶仍然有较微弱的发病症状. 1 株(14%) 早期表现出明显的感病症状, 10 d 后症状较对照有所减缓, 30 d 后的新叶没有发现明显的花叶、皱缩症状(图 9).

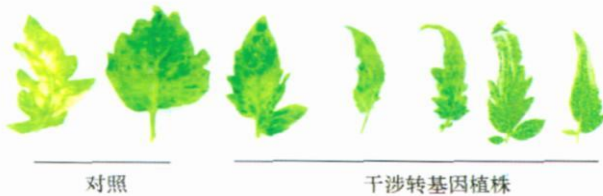


图 9 *SteIF4E* 干涉载体转化植株(株系 1) 接种 CMV 后的症状表现

分别对接种病毒 30 d 后转基因番茄及对照植株进行 ELISA 检测. 接种 PVY 植株中部分病株 ELISA 检测其病毒含量接近于对照, 而大部分抗病植株在接种 30 d 后 ELISA 几乎检测不到病毒, 明显低于对照植株. 接种 CMV 植株的大部分 ELISA 检测出一定病毒含量, 略低于对照植株, 少数植株没有检测到病毒(表 1).

表 1 转基因番茄接种病毒 30 d 后 ELISA 分析结果(OD_{405})

株系	接种病毒种类	
	PV Y	CM V
CK	0.432±0.008	0.501±0.012
1	0.094±0.009	0.461±0.006
2	0.092±0.007	0.353±0.008
3	0.082±0.005	0.251±0.007
4	0.104±0.011	0.287±0.006
5	0.079±0.010	0.405±0.011
6	0.074±0.003	0.139±0.008
7	0.263±0.007	0.082±0.014

为了检测病毒在基因转化材料中的积累情况, 通过对病毒外壳蛋白编码基因半定量 RT-PCR 和 Northern blot 来确定植物体内的病毒积累量, 从而推测基因干涉对植株的抗病毒能力的影响. 图 10 和图 11 分别为接种病毒 30 d 后利用病毒特异 RT-PCR 和 Northern blot 两个层面反映了番茄 *eIF4E* 干涉载体转化对 PVY 和 CMV 病毒的影响. 从图中可以看出番茄 *eIF4E* 干涉载体转化材料相对于对照, 接种后病毒 RNA 积累受到了一定程度的抑制, 其中对于 PVY 的抑制作用更为明显, 而对于 CMV 的抑制效果较差. 这与植株接种后发病症状及发病程度是相吻合的.

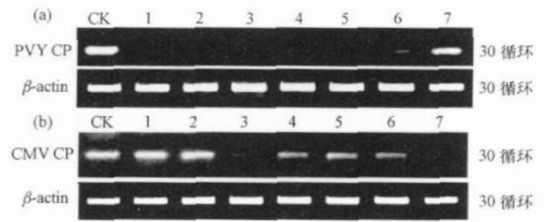


图 10 *SteIF4E* 干涉植株中病毒 RNA 的 RT-PCR 检测 (a) 番茄 *SteIF4E* 干涉植株中 PVY 病毒 RNA RT-PCR 检测. CK, ZS5; 1—7, 转基因植株 (b) 番茄 *SteIF4E* 干涉植株中 CMV 病毒 RNA RT-PCR 检测. CK, ZS5; 1—7, 转基因植株

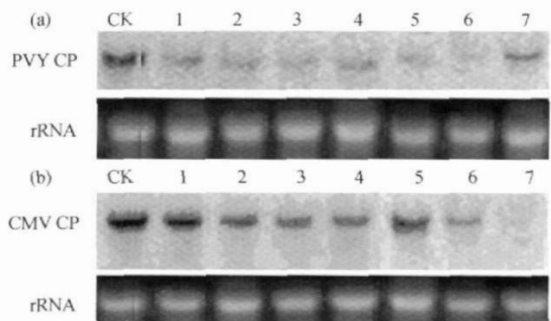


图 11 *SteIF4E* 干涉对病毒 RNA 积累的影响 (a) 番茄 *SteIF4E* 干涉对 PVY 病毒 RNA 积累的影响. CK, ZS5; 1—7, 转基因植株; (b) 番茄 *SteIF4E* 干涉对 CMV 病毒 RNA 积累的影响. CK, ZS5; 1—7, 转基因植株. 杂交结果(上); RNA 上样量对照(下)

3 讨论

就不同病毒而言, *eIF4E* RNA 干涉对 PVY 抗性的调控效果比 CMV 调控效果好, 基因转化植株

对PVY的抗性得到明显提高,而对CMV的抗性较差.这可能是因为马铃薯Y病毒的基因组5'-末端共价结合基因组连接蛋白(VPg),而VPg参与病毒侵染过程包括病毒RNA复制,病毒在细胞间以及长距离传输.而eIF4E与VPg之间的互作则可对病毒基因组翻译和复制起到重要的作用,干扰它们之间的互作,增强植物的抗病毒能力.黄瓜花叶病毒不存在VPg结构,其抗病毒能力受*eIF4E*调控幅度小于转化植株对PVY抗性.

转*eIF4E*干涉基因的番茄株系中,内源*eIF4E*转录受到明显抑制(图7),在后期的接种PVY鉴定也显示出较好的抗性,在新叶中很难检测到病毒RNA(图10,11),由此可见抑制内源*eIF4E*也就干预病毒RNA积累,病毒在细胞间以及长距离传输等环节,影响病毒侵染过程.我们推测*eIF4E*干涉植株抑制了病毒在植物体内的移动.同样研究认为,玉米对甘蔗花叶病毒(sugarcane mosaic virus, SCMV)和玉米矮花叶病毒(maize dwarf mosaic virus, MDMV)的抗性机制是病毒在抗病品种体内的增殖未受到抑制,而是移动受到了限制^[26].当然,可以通过带病毒的枝条进行嫁接来确定病毒是否在体内转移.

应当指出转化植株相对于对照组也表现出对CMV一定程度的抗性.CMV属三分体基因组,为单链RNA,含4个RNA片段,即RNA1-4.在所有4种RNA中的5'-端还有一个m⁷G的帽子结构^[14].在CMV的侵染与复制过程中,eIF4E可能正如与真核细胞mRNA帽子结合一样,eIF4E可能也会与CMV帽子结构结合促进其翻译.这也从某种程度上解释了文中植物对CMV的抗性同样受*eIF4E*干涉的调控.拟南芥中*eIF4E*和*eIF4G*突变体可以产生对CMV和芜菁皱缩病毒(turnip crinkle virus, TCV)产生抗性.TCV有关RNA转录和蛋白质翻译受阻^[14].与真核mRNA不同,TCV RNA既没有5'-帽子结构也没有poly(A)末端.由此可见,TCV病毒侵染寄主与CMV或PVY的机制皆有所差异,其侵染周期依赖于另一种翻译起始因子eIF4G.这就提出了一个问题,即在寄主植物中众多的其他翻译起始因子是否也参与了特定病毒的复制和侵染过程.

基因工程为提高植物对病毒的抗性提供了多种

策略.在这些策略中,以病毒来源的基因介导的抗性取得的成就最大,而植物自身基因也不断应用于作物遗传改良研究^[27].包括eIF4E在内的诸多真核翻译起始因子不仅对mRNAs翻译起重要作用,影响细胞的生长和分化^[28],在植物改良研究中也发挥了作用^[29].通过RNA干涉途径来探讨真核翻译起始因子4E介导的抗病毒特性.从目前研究初步结果来看,干涉真核翻译起始因子4E对于提高番茄的病毒抗性是有效的.这与目前抗病毒基因工程中广泛采用的病毒来源的基因策略相比至少有两个优势.一是真核翻译起始因子4E来源与植物自身,所带来的生物安全性问题较少.二是真核翻译起始因子4E是植物普遍存在的蛋白因子,具有广泛性.当然这种翻译起始因子4E介导的抗病毒特性能否推广至其他作物上有待于进一步研究.虽然研究中PVY并非番茄主要病害,但所提出的策略无疑为其他作物的PVY抗性育种提出了新的思路.

通过RNA干涉调控番茄真核翻译起始因子4E,得到一定程度抗病毒病特性的植物材料,也从生物学功能验证角度为阐述真核翻译起始因子4E参与病毒复制和侵染寄主提供了直接的生物学证据.

参 考 文 献

- 1 庞俊兰,徐惠君,杜丽璞,等.土传花叶病毒外壳蛋白基因导入小麦的研究.中国农业科学,2002,35(7):738-742
- 2 朱常香,刘红梅,宋云枝,等.RNA介导的病毒抗性在转基因烟草中的遗传分析.遗传学报,2005,32(1):94-103
- 3 王慧中,赵培浩,徐吉臣,等.转WMV-2外壳蛋白基因西瓜植株的病毒抗性.遗传学报,2003,30(1):70-75
- 4 竺晓平,朱常香,宋云枝,等.CP基因3'端短片段介导的对马铃薯Y病毒的抗性.中国农业科学,2006,39(6):1153-1158
- 5 牛颜冰,李桂新,温瑞,等.转病毒移动蛋白及复制酶基因烟草的协生和重组风险分析.中国农业科学,2003,36(4):393-397
- 6 牛颜冰,于翠,张凯,等.瞬时表达黄瓜花叶病毒部分复制酶基因和番茄花叶病毒移动蛋白基因的dsRNA能阻止相关病毒的侵染.农业生物技术学报,2004,12(4):484-485
- 7 张玉满,王寰宇,刘玉乐.中国番茄黄化曲叶病毒(TYLCCV-CHD)外壳蛋白基因在大肠杆菌中的表达及抗血清的制备.自然科学进展,2001,11(2):142-146
- 8 张余洋,欧阳波,叶志彪.无抗性标记基因转基因植物研究进展.农业生物技术学报,2004,12(5):589-596

- 9 陈丽静, 李君明, 宋燕, 等. 番茄抗番茄花叶病毒和斑点萎凋病毒病基因 PCR 标记的同时鉴定. 中国农业科学, 2004, 37(7): 982—986
- 10 Baulcombe DC, Saunders GR, Bevan MW, et al. Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. Nature, 1986, 321: 446—449
- 11 温孚江, 朱常香. 转录后基因沉默与植物的病毒抗性. 生物工程学报, 2001, 17(3): 231—235
- 12 Zhang Y, Li H, Ouyang B, et al. Regulation of eukaryotic initiation factor 4E and its isoform: implications for antiviral strategy in plants. J Integr Plant Biol, 2006, 48(10): 1129—1139
- 13 Duprat A, Caranta C, Revers F, et al. The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. Plant J, 2002, 32(6): 927—934
- 14 Yoshii M, Nishikiori M, Tomita K, et al. The *Arabidopsis Cucumovirus Multiplication 1* and *2* loci encode translation initiation factors 4E and 4G. J Virol, 2004, 78(12): 6102—6111
- 15 Ruffel S, Dussault MH, Palloix A, et al. A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). Plant J, 2002, 32(6): 1067—1075
- 16 Ruffel S, Gallois JL, Moury B, et al. Simultaneous mutations in translation initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E are required to prevent pepper vein mottle virus infection of pepper. J Gen Virol, 2006, 87(7): 2089—2098
- 17 Nicaise V, German-Retana S, Sanjuán R, et al. The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus lettuce mosaic virus. Plant Physiol, 2003, 132(3): 1272—1282
- 18 王秀芳, 郭兴启, 孟祥兵, 等. 马铃薯 Y 病毒属病毒与植物互作的分子生物学. 山东农业大学学报, 2002, 33(3): 386—390
- 19 Léonard S, Viel C, Beauchemin C, et al. Interaction of VPg-Pro of *Turnip mosaic virus* with the translation initiation factor 4E and the poly(A)-binding protein in planta. J Gen Virol, 2004, 85(4): 1055—1063
- 20 Beauchemin C, Boutet N, Laliberté JF. Visualization of the interaction between the precursors of VPg, the viral protein linked to the genome of turnip mosaic virus, and the translation eukaryotic initiation factor iso 4E in planta. J Virol, 2007, 81(2): 775—782
- 21 Grzela R, Strokowska L, Andrieu JB, et al. Potyvirus terminal protein VPg, effector of host eukaryotic initiation factor eIF4E. Biochimie, 2006, 88(7): 887—896
- 22 Michon T, Estevez Y, Walter J, et al. The potyviral virus genome-linked protein VPg forms a ternary complex with the eukaryotic initiation factors eIF4E and eIF4G and reduces eIF4E affinity for a mRNA cap analogue. FEBS J, 2006, 273(6): 1312—1322
- 23 Kang BC, Yeam I, Li H, et al. Ectopic expression of a recessive resistance gene generates dominant potyvirus resistance in plants. Plant Biotechnol J, 2007, 5(4): 526—536
- 24 Zhang YY, Li HX, Ouyang B, et al. Chemical-induced autoexcision of selectable marker in elite tomato plants transformed with gene conferring resistance to lepidopteran insects. Biotechnol Lett, 2006, 28(16): 1247—1253
- 25 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W 著. 黄培堂译. 分子克隆实验指南 (第三版). 北京: 科学出版社, 2002
- 26 Olson AJ, Pataky JK, D'Arcy CJ, et al. Effects of drought stress and infection by maize dwarf mosaic virus on sweet corn. Plant Dis, 1990, 74(2): 147—151
- 27 谢先芝, 黄美娟, 吴乃虎. 转番茄蛋白酶抑制剂 II 基因烟草植株的培育及其抗虫特性分析. 自然科学进展, 2002, 12(2): 145—150
- 28 吕红琼, 周林静, 王平. 真核翻译起始因子 eIF4E 与恶性肿瘤的研究进展. 实用肿瘤学杂志, 2007, 21(1): 88—91
- 29 凌宇, 王宏芝, 李瑞芬, 等. eIF-5A 的功能及其在植物改良中的应用. 自然科学进展, 2007, 17(3): 297—304