

基因沉默番木瓜环斑病毒复制酶基因 (*PRSV-Nib*) 获得抗病 病毒番木瓜的研究

吴清铨^{1,2}, 贾瑞宗^{2*}, 郭静远², 杨牧之², 胡玉娟², 郝志刚², 赵 辉^{2**}, 郭安平^{2**}

1. 海南大学热带作物学院, 海南海口 570228; 2. 海南省南繁生物安全与分子育种重点实验室/中国热带农业科学院
三亚研究院/中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南三亚 572024

摘 要: 番木瓜是重要的热带经济水果。番木瓜环斑病毒 (*Papaya ringspot virus*, PRSV) 是番木瓜的重要病毒病, 经常导致严重的产量损失和质量恶化。自从 1998 年第一例转基因番木瓜问世以来, 使得基于“致病菌衍生的抗病性 (*pathogen-derived resistance*, PDR)”的抗病育种策略获得成功广泛应用。然而依赖于序列同源性的抗病性与病毒突变导致多样性增加之间的矛盾成为番木瓜育种科学家的新挑战。本研究拟采用 RNAi 策略针对复制酶 (*nuclear inclusion b*. *Nib*) 获得广谱抗 PRSV 番木瓜新种质。通过团队已建立的胚性愈伤诱导-农杆菌介导转化-再生苗诱导的番木瓜遗传转化体系, 共获得经过抗性筛选的再生苗 52 株, 通过特异性 PCR 进行筛选共计获得 24 株转基因阳性植株。通过对 T₀ 代田间自然发病试验中, 转基因番木瓜株系抗病性明显高于非转基因对照, 其中 *NibB5-2* 田间抗病性最优。通过 *hiTAIL-PCR* 方法确定 *NibB5-2* 插入位点位于第 2 号染色体 *supercontig_30* 的 1976766 的位置。T₁ 代接种试验中, 无病毒积累且无发病症状, 初步确认具有良好的病毒抗性, 为番木瓜抗病育种提供新思路。

关键词: 番木瓜; 番木瓜环斑病毒; *Nib* 基因; RNA 介导的病毒抗性

中图分类号: S436.67 文献标志码: A

Gene Silencing of *Papaya ringspot virus* Replicase Gene (*PRSV-Nib*) to Obtain Virus Resistant Papaya

WU Qinghua^{1,2}, JIA Ruizong^{2*}, GUO Jingyuan², YANG Muzhi², HU Yujuan², HAO Zhigang², ZHAO Hui^{2**},
GUO Anping^{2**}

1. College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Hainan Key Laboratory for Biosafety Monitoring and Molecular Breeding in Off-Season Reproduction Regions / Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572024, China

Abstract: Papaya is an economically important tropical fruit. *Papaya ringspot virus* (PRSV) is an important virus disease of papaya, often causing significant yield losses and quality deterioration. Since the introduction of the first transgenic papaya in 1998, PDR-based breeding strategies for disease resistance have been successfully applied. The contradiction between disease resistance based on sequence homology and increased virus genetic diversity became a new challenge for papaya breeding. In this study, we propose to use RNAi strategies aim at nuclear inclusion b gene (*Nib*) to obtain broad-spectrum resistance to PRSV papaya. With optimized embryo callus generation-*Agrobacterium* mediated transformation-shoot regeneration, 52 shoots were obtained after resistance screening and a total of 24 transgenic positive shoots were obtained by specific PCR screening for the T₀ generation. In the T₀ generation field natural disease test,

收稿日期 2022-12-16; 修回日期 2023-02-15

基金项目 海南省重大科技计划项目 (No. ZDKJ202002); 海南省重点研发计划项目 (No. ZDYF2022XDNY257); 崖州湾科技城菁英人才项目 (No. SCKJ-JYRC-2022-67)。

作者简介 吴清铨 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 南繁育种与生物安全; *同等贡献作者: 贾瑞宗 (1980—), 男, 博士, 副研究员。 **通信作者 (Corresponding author): 赵 辉 (ZHAO Hui), E-mail: zhaohui@itbb.org.cn; 郭安平 (GUO Anping), E-mail: gap211@126.com。

the transgenic papaya strains were significantly more resistant to disease than the non-transgenic control, with NibB5-2 having the best resistance in the field. Molecular characterization of the insertion site of Nib5-2 was located at position 1976766 on chromosome 2 supercontig_30 by hiTAIL-PCR method. Green house inoculation test of NibB5-2 T1 generation, there was no virus accumulation and no disease symptoms, confirmed the resistance. Our result reveal that RNAi silencing the *Nib* gene enhance the papaya virus resistance, meanwhile enriched the candidate genes for virus resistance breeding.

Keywords: *Carica papaya* L.; *Papaya ringspot virus*; *Nib* gene; RNA-mediated virus resistance

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.04.019

番木瓜 (*Carica papaya* L.) 是热带和亚热带地区重要的经济水果之一, 其富含丰富的营养价值与潜在的医疗价值, 深受大众喜爱。番木瓜最主要的病害是番木瓜环斑病毒病 (*Papaya ringspot virus*, PRSV) [1-2], 对番木瓜产业造成重大打击。传统的病毒防治措施如交叉保护 [3-4], 田间综合管理 [5], 传播媒介防治 [6-7], 以及抗病育种 [8-9] 在一定程度上阻止了病毒的传播, 但这并不足以避免农业生产上的损失 [10]。通过基因工程提高番木瓜的抗病能力, 使得转基因番木瓜成为早期商业化种植的成功案例之一。

根据“致病菌衍生的抗病性 (pathogen-derived resistance, PDR)”原理, 第一例夏威夷抗病毒的转基因番木瓜问世, PDR 的抗病育种策略是转录后基因沉默 (post-transcriptional gene silencing, PTGS) [11-12]。RNA 干扰 (RNAi) 是表现在转录水平上的基因沉默 [13], 已被证明在病毒防御反应中发挥作用, 并已成功地作为生物技术工具用于转基因植物的病毒抗性。RNAi 是一种由小 RNA 介导的基因表达调控机制。RNAi 过程涉及 3 个基本特征: 双链 RNA (dsRNA) 诱导, dsRNA 被切割成 21~25 个核苷酸大小的小干扰 RNA (siRNA) [14-15], 以及 siRNA 被整合到 RNA 诱导沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 中进行序列特异性降解 [16]。通过使用 RNAi 技术, 针对目标 mRNA 的外源性双链 RNA, 抑制了靶基因的表达水平。由于外源序列并未表达产物, RNA 介导的病毒抗性具有生物安全优势, 且降低了引入外源基因植株带来的风险 [17]。

通过转病毒外壳蛋白 (coat protein, CP) 基因在植物中表达而产生抗病性 [18-20]。然而, 外壳蛋白基因可能与自然界中的其他病毒或致病因子重组成新的致病因子产生可传播和流行的危险病毒 [21-22]。复制酶 (nuclear inclusion b, Nib) 基因是一种依赖于病毒 RNA 的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) [23], 用病毒复

制酶转化植物已被证明可以产生稳定高效的抗性, 通过与复制酶 mRNA 结合 [24], 阻断病毒 mRNA 的复制或使病毒 mRNA 通过 RNAi 衰减直接影响病毒 RNA 的复制 [25], 是获得病毒抗性植物有效的方法。目前通过转病毒 *Nib* 基因使作物获取抗性的方法被广泛运用于大豆 [26]、小麦 [27-28]、豌豆 [29]、烟草 [24, 30]、芥菜 [25]、大白菜 [31] 等作物。

前期工作发现, 海南番木瓜环斑病毒遗传多样性差异较大 [32], 大规模种植单一抗性的转基因番木瓜很容易促进靶标病毒的突变, 导致抗性丧失。本团队前期已经获得 1 个基于番木瓜外壳蛋白基因沉默番木瓜株系的培育并验证具有一定抗性 [33-34], 建立基于多目标基因的沉默 (CP+*Nib*) 来提高番木瓜的广谱抗性, 以期应对靶标病毒的突变以及遗传多样性。因此本研究在前期工作的基础上, 采取了对 *Nib* 基因沉默的策略创制番木瓜新品系, 并验证其抗病性, 积累抗病新资源。

1 材料与方法

1.1 材料

受体材料选择番木瓜品种穗中红 48, 由广州市果树研究所惠赠。遗传转化方法及再生苗由本实验室提供 [32-34]。大肠杆菌 DH5 α 购自 Sangon 公司 (B528413), 农杆菌 GV3101 由本实验室保存。载体采用新霉素磷酸转移 II 基因 (*Neomycin phosphotransferase II*, *NPT II*) 作为标记基因, 抗生素为卡那霉素 (50 mg/L)。载体构建如图 1。

试剂与仪器: 植物总 RNA 抽提纯化试剂盒 (TIANGEN, DP441-H)、多糖多酚植物基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN, DP360)、FastKing RT Kit (TIANGEN, KR116) 用于核酸提取试验; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (Sangon, B511139)、质粒小提试剂盒 (Omega, D6943-100T)、pUCm-T vector (Sangon, B620435)、IPTG 溶液 (Sangon, B541007)、X-Gal 溶液 (Sangon, B541006) 用于 hiTAIL-PCR 验证转化插入的位点实验, 其他常用

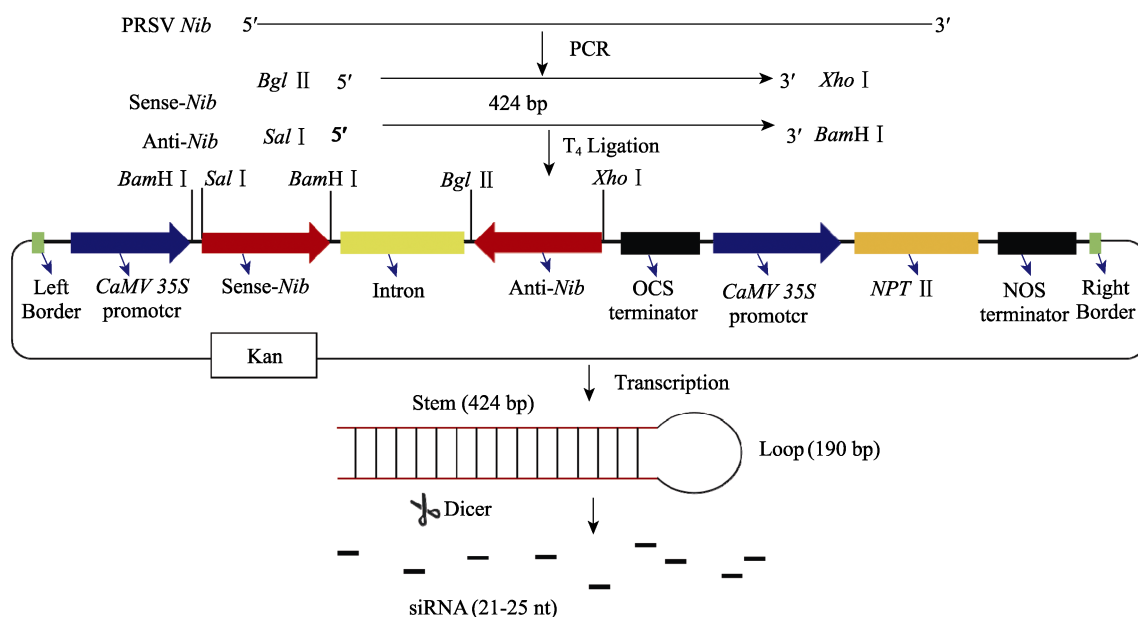


图 1 植物表达载体的构建示意图

Fig. 1 Schematic representation of the construction of plant expressing vector

试剂为国产分析纯。超微紫外分光光度计 (倍辉, DS-11)、冷冻型离心机 (Therom Fisher, Micro 21R) 用于核酸提取、质粒提取; PCR 仪 (Analytik Jena AG, TAdvanced 96SG) 用于阳性株系的筛选; 电泳仪 (北京君意东方电泳设备有限公司, JY600E) 用于 PCR 检验; 化学发光成像系统用于凝胶回收 (Azure, C300); 控温摇床用于大肠杆菌转化 (IKA, 4000i); 电热恒温水浴箱用于大肠杆菌转化 (上海一恒, DK-8D)。

1.2 方法

1.2.1 引物合成 引物设计使用 NCBI 在线引物设计工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 在插入位点上游 286 bp 处设计验证引物 NibB5-2-533F, 在插入位置的下游 451 bp 处设计验证引物 Nibb5-2-1269R; 在插入位点上游和载体上设计 2 对嵌合引物 NibB5-2-100F/NibB5-2-557R 和 NibB5-2-121F/NibB5-2-515R, 用于插入位点的验证。引物及探针序列见表 1, 引物合成以及 DNA 测序均由北京六合华大基因科技有限公司完成。

1.2.2 核酸提取方法 (DNA/RNA) 将 0.2 g 新鲜番木瓜叶片在液氮中充分研磨后, 使用植物基因组提取试剂盒提取植物总 DNA, 用于转化特异性 PCR 进行阳性转化株的筛选, 通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性, 并利用紫外分光光度计测定 DNA 浓度和纯度, -20°C 保存备用。将 50 mg 的番木瓜叶片在液氮充分研磨后使用植物总 RNA 抽提纯化试剂盒提取植物总 RNA,

通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 利用紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度, -80°C 保存, 用于后续研究叶片中 PRSV 的病毒积累量。

1.2.3 转基因植株转化事件特异性 PCR 筛选 阳性株系 用转化事件特异 PCR 进行阳性转化苗的筛选。引物分别是目标基因 Nib 引物 (PRSV-Nib3/PRSV-Nib4)、转化事件特异性引物 (CaMV35S F/Nib4) 和内参引物 (Papain F/Papain R) (表 1), 以阳性质粒为阳性对照 (CK^{+}), 水为阴性对照 (CK^{-})。PCR 扩增反应体系为: 12.5 μL 2 $\times$ Taq master Mix、1.0 μL 上游引物 (100 $\mu\text{mol/L}$)、1.0 μL 下游引物 (100 $\mu\text{mol/L}$)、1.0 μL 番木瓜基因组 DNA 模板、9.5 μL Nuclease-free water。PCR 扩增条件: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72°C 再延伸 10 min。反应完毕后, 通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后 EB 染色, 拍照记录。

1.2.4 hiTAIL-PCR 方法确定转化株系的插入位点位置 采用高效热不对称交互式 PCR (high-efficiency TAIL-PCR, hiTAIL-PCR)^[35] 方法检测阳性品系插入位点的侧翼序列。根据已有报道的研究方法^[36]进行 PCR 扩增, 反应结束后将 PCR 产物切胶回收, 将回收的目标条带 DNA 与 pUCm-T vector 连接进行克隆载体的转化, 最后通过菌液 PCR 挑选每个转化的 3 个重复阳性菌送往北京六合华大基因科技有限公司进行测序。

表 1 本研究所用引物
Tab. 1 Primers used in this work

目标基因 Target gene	引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature/℃	序列长度 Size /bp	目的 Purpose	参考文献 References
<i>Papain</i>	Papain F	TGCTTGACTGCGACAGAC	55	144	内参基因	[20]
	Papain R	CTTTCTCCCTTGAGCGAC				
<i>CaMV35S</i>	CaMV35S F	GCTCCTACAAATGCCATCATTGC	63	195	筛选转基因株系	
	CaMV35S R	GATAGTGGGATTGTGCGTCATCCC				
<i>NPT II</i>	NPTII F	ACTGGGCACAACAGACAATCG	60	280		
	NPTII R	GCATCAGCCATGATGGATACTTT				
<i>Nib</i>	PRSV-Nib3	CTGTATTGCCATTACCCC	55	424		[34]
	PRSV-Nib4	CTTGCTCAAGCACCCATT				
<i>Nib</i>	NibB5-2-100F	AGCCTGAATGGCGAATGCTA	60	480	验证转化插入的位点	本实验
	NibB5-2-557R	TCTGGGTTCAGATTTTACCAGA				
	NibB5-2-121F	AGCAGCTTGAGCTTGGATCA	60	415		
	NibB5-2-515R	TGTTACCAATCCTCTACACG				
	NibB5-2-533F	TTGTTACCAATCCTCTATACG	60	737		
	NibB5-2-1269R	TGCTGACGTGGTGCTATT				
	LAD1	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCVNVNNNGGAA			hiTAIL-PCR	[35]
	LAD2	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBNBNNGGTT				
	LAD3	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCVVNNNCCAA				
	LAD4	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBDBNNNCGGT				
	AC1	ACGATGGACTCCAGAG				
	RB-0B	CGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTT				
<i>PRSV-CP</i>	CP (9268)	AGCTGTGGATGCTGGTTTGA	56	712	病毒积累量	[32]
	CP (9979)	CATCTGCATGTGAGCTTCGC				

Note: B=C/T, D=A/G/T, N=A/C/T/G, V=A/C/G.

将获得的 DNA 序列在 Phytozome v13.0 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>) 在线软件与番木瓜基因组 (*C. papaya*, ASGPBv0.4) 进行 Blast 比对, 以获得侧翼序列确定插入的位点信息。

1.2.5 插入位点验证 利用引物 NibB5-2-533F/Nibb5-2-1269R 验证插入位点的准确性。使用 2 对嵌合引物 NibB5-2-100F/NibB5-2-557R 和 NibB5-2-121F/NibB5-2-515R 进一步验证插入位点。PCR 扩增反应体系为: 12.5 μL 2×*Taq* master Mix, 1.0 μL 上游引物 (100 μmol/L), 1.0 μL 下游引物 (100 μmol/L), 1.0 μL DNA 模板, 9.5 μL Nuclease-free water。PCR 扩增条件: 95 ℃预变性 5 min; 95 ℃变性 30 s, 60 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 30 s, 共 35 个循环; 72 ℃再延伸 10 min。扩增结束后通过 1.0%琼脂糖凝胶电泳后 EB 染色, 拍照记录。

1.2.6 不同转化品系 T₀ 代田间自然抗病评估 将转 *Nib* 基因的 T₀ 代幼苗以及非转基因对照移栽到田间中国热带农业科学院文昌试验基地 (19°32'14.521"N, 110°44'51.652"E, 具有隔离条件), 进行抗病性筛选。分别在移栽 3 个月后第 90、100、110、120、130、140、150、180、210、240 天观测和采样。

1.2.7 T₁ 代植株病毒接种试验 海南 PRSV 病毒活体植株保存于本实验室。参照黄静等^[33]的 PRSV 制备病毒接种液和接种方法, 具体如下:

(1) 取含有 PRSV 病毒的番木瓜叶样适量, 将感染病毒的叶片和磷酸缓冲液 (1×PBS) 按照 1:10 的比例 (即 1 g 叶片, 10 mL PBS) 混匀后充分研磨至匀浆状, 5000 r/min 离心 10 min 后, 吸取上清液作为接种液, 4 ℃保存备用。

(2) 在茎尖向下数第三叶, 人工接种 PRSV。

首先在叶片表面上洒上少许石英砂, 用碾磨棒或者指腹由叶脉向叶尖轻轻摩擦, 而后滴加 10 μ L 接种液并将其在叶片表面涂抹均匀。

(3) 转基因株系 (NibB5-2 T₁ 代) 为实验组, 非转基因株系 (NibB5-5 T₁ 代) 为对照组。分别进行病毒接种试验, 只接种缓冲液 (不含病毒) 的对照试验, 和不接种对照试验。每种处理设 3 个生物学重复。接种病毒后第 0、4、8、12、16、20、24、28、32 天观测发病情况, 并取相邻叶片 (茎尖向下数第二叶片) 检测 PRSV 病毒积累量。

1.2.8 PRSV 病毒积累量检测 番木瓜总 RNA 的提取参见 1.2.2, 利用 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒以番木瓜总 RNA 为模板合成 cDNA 第一链。反应体系和程序为: 2 μ L 5 $\times$ g DNA Buffer、2 μ L Total RNA、6 μ L Nuclease-free water, PCR 仪中 42 $^{\circ}$ C 3 min 后, 置于冰水混合物中放置 3 min。然后加入 2 μ L 10 $\times$ King RT Buffer、1 μ L FastKing RT Enzyme Mix、2 μ L FQ-RT Primer Mix、5 μ L Nuclease-free water, 于 42 $^{\circ}$ C 15 min, 95 $^{\circ}$ C 3 min,

于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

使用 PRSV-CP 特异性引物进行 PCR 检验, 以病毒接种液作为阳性对照 (CK⁺), 无核酸酶水作为阴性对照 (CK⁻)。PCR 扩增反应体系为: 12.5 μ L 2 $\times$ Taq master Mix、1.0 μ L CP (9268)、1.0 μ L CP (9979)、1.0 μ L cDNA 模板、9.5 μ L Nuclease-free water。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应完毕后, 通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后 EB 染色, 拍照记录。

2 结果与分析

2.1 PCR 筛选阳性转化株系

本研究共计获得 52 株已经过抗性筛选的再生苗, 用转化事件特异 PCR 对再生苗进行筛选, 一共筛选出 24 株阳性株系, 图 2 为部分筛选结果, 选取在田间表现良好、栽培后能正常开花结果、抗性表现较好的 T₀ 代阳性转化株系代表 Nib5-2 进行分子特征检测。

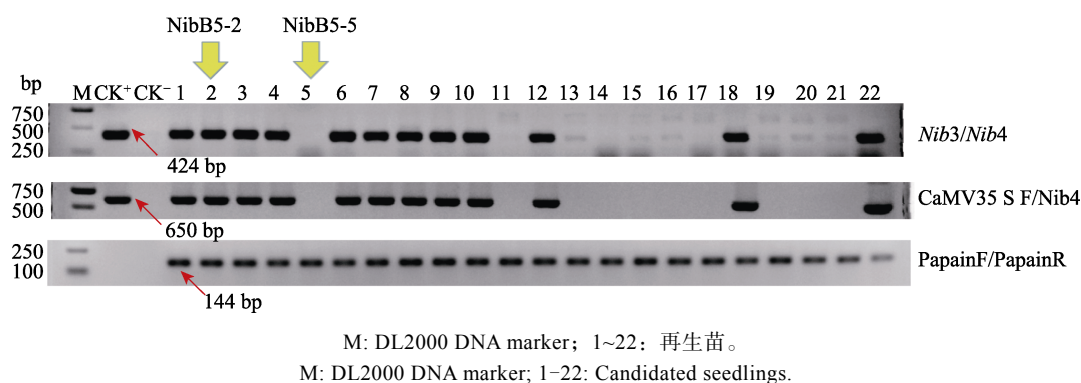


图 2 利用转化事件特异 PCR 检测阳性再生苗

Fig. 2 Detection of positive regenerated seedlings using transformation event-specific PCR

2.2 hiTAIL-PCR 验证转化体在番木瓜基因组上的插入位点

NibB5-2 样品的 hiTAIL-PCR 电泳结果如图 3, 将测序结果经过 Blast 比对, 发现插入位点位于 2 号染色体的 supercontig_30.113 的 1976766 处, 比对的详细结果为 Score=675 bits (748), Expect=0.0 Identities=376/377 (99%) (图 3)。插入位点上、下游最近的基因距离为 3.6 kb, 插入位点上游 10 kb 内有 2 个 Ankyrin Repeat 家族蛋白 (evm.TU.supercontig_30.153、evm.TU.supercontig_30.149), 下游 10 kb 内有 2 个 Ankyrin Repeat 家族蛋白 (evm.TU.supercontig_30.154、evm.TU.supercontig_

30.155)、1 个反转录转座子闭合蛋白 (PF03732, evm.TU.supercontig_30.156) 和 1 个糖基转移酶 (evm.TU.supercontig_30.157)。

插入位点的上游引物 NibB5-2-533F 与下游引物 NibB5-2-1269R 在非转基因番木瓜 DNA 中扩增得到预期约 737 bp 的产物; 而在转基因株系中, 由于外源载体的插入, PCR 产物预计大小为 4.2 kb + 737 bp (图 4)。将插入位点上游引物 NibB5-2-100F/NibB5-2-121F 和载体上的引物 NibB5-2-557R/NibB5-2-515R 匹配, 扩增番木瓜基因组和载体序列的嵌合产物, 在转基因番木瓜中扩增得到预期大小条带 (480 bp 和 415 bp), 而在非转基因

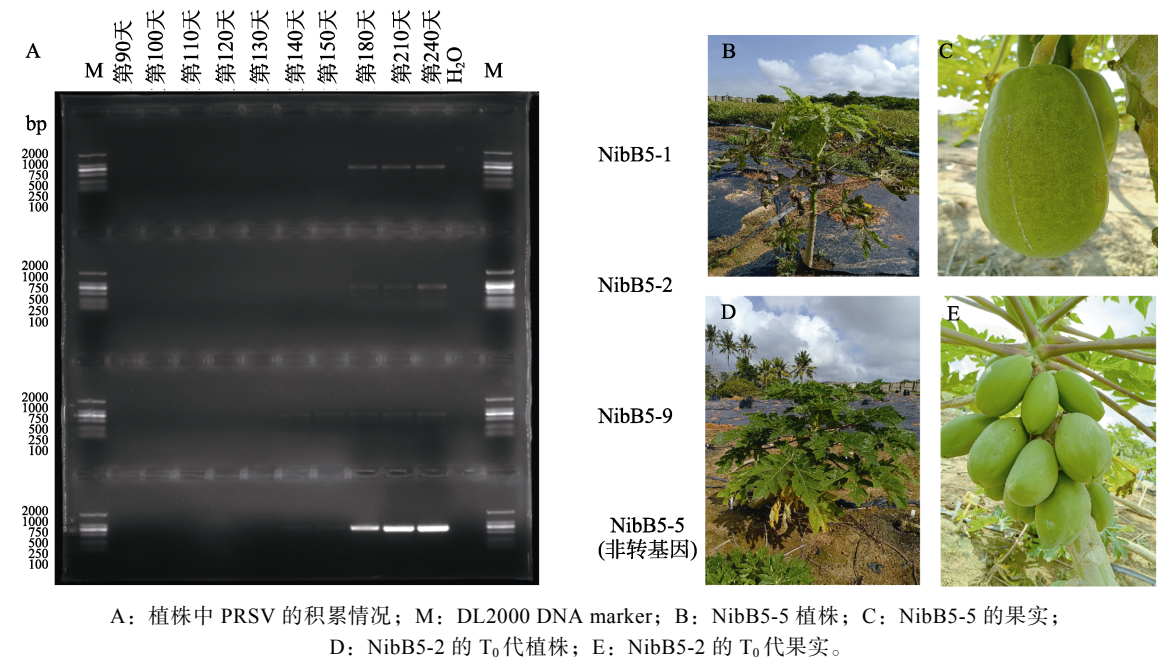
测发现,转 *Nib* 番木瓜株系和非转基因株系在田间的抗病性差异明显。非转基因株系均感病,具体表现为在移苗后第 5 个月时表现出病症,随着时间的

延长，病症日益明显，在第 6 个月时出现典型病症如果实上出现环斑（图 5C）；转 *Nib* 番木瓜株系移苗后，植株整体表现健康，一直至第 12 个月无明显症状。通过对 3~6 个月番木瓜样品进行病毒积累量的 PCR 检测，NibB5-1 在第 151 天开始出现病毒积累，NibB5-2 在第 151 天开始出现病毒积累，NibB5~9 在第 112 天出现病毒积累，非转基因对照 NibB5-5 在第 112 天出现病毒积累（图 5A）。

2.4 转基因番木瓜 T₁ 代抗性评价

转基因番木瓜 NibB5-2 T₁ 代株系和非转基因

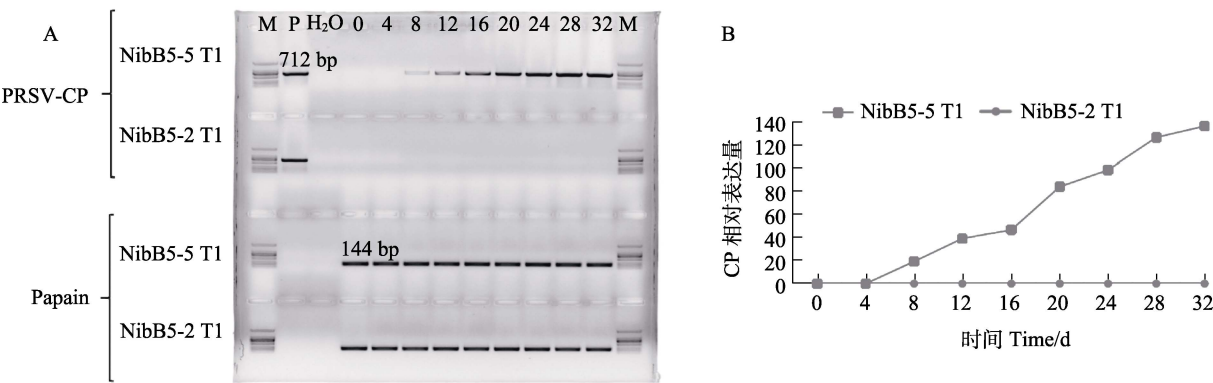
对照在接种病毒后 32 d 内抗病性差异明显。3 株接种病毒的对照植株表现一致，在第 8 天时表现出病症，随着时间的延长，病症日益明显，在第 24 天时出现病症典型；同时接种病毒的 3 株 NibB5-2 T₁ 植株在 32 d 内，部分有病毒积累，但表型都正常。9 个采集时间点的植物样品进行 PCR 检测病毒积累量的检测结果如图 6A。在相同模板量下，对照植株的凝胶检测灰度呈指数增长趋势，即随着时间的延长感染病毒量逐渐递增，NibB5-2 T₁ 代植株基本无变化（图 6B）。



A: Accumulation of PRSV in plants; M: DL2000 DNA Marker; B: NibB5-5 plants; C: Frui of NibB5-5; D: T₀ generation plants of NibB5-2; E: T₀ generation fruit of NibB5-2 .

图 5 T₀ 代番木瓜田间不同时期病毒积累量

Fig. 5 Accumulation of T₀ generation papaya virus at different times in the field



A: Post-inoculation monitoring of PRSV-CP accumulation in transgenic papaya NibB5-2 T₁ plants and non-transgenic papaya NibB5-5 T₁ plants; M: DL2000 DNA Marker. B: By gel electrophoresis analysis software Image J analysis the relative amount of virus.

图 6 通过检测转基因番木瓜 T₁ 代的 PRSV 积累量对其抗性评价

Fig. 6 Evaluation of the resistance of transgenic papaya by measuring the accumulation of PRSV in transgenic T₁ generation

3 讨论

PRSV 是海南番木瓜生产的主要制约因素。虽然基于 siRNA 和植物人工微 RNA (amiRNA) 的短发夹 RNA (shRNA) 可以有效地减少病毒复制, 但广泛的病毒遗传变异可能会使病毒逃逸^[37], PRSV 存在地理分化, 各地的病毒株系差异大, 在海南不同地区分布的 PRSV 病毒株系差异大^[32, 38], 所以抗 PRSV 转基因番木瓜品种的种植仅限于某些地理区域^[39]。RNA 介导的病毒抗性受到入侵病毒与目标转基因之间序列同源性的影响^[40], 若 siRNA 与其靶标之间存在不匹配, 会影响靶标 RNA 的识别切割, 干扰效应降低, 甚至使 siRNA 失活^[41-42]。此外, 有研究表明, 抗病毒效果可能在于小靶区的同源性而非全序列的同源性^[43-44]。课题组前期通过海南全境内 PRSV 遗传多样性进行研究发现, 不同群体 (Hainan I, II, III)^[32] 还根据 RNAi 原理利用海南 PRSV-CP 基因保守序列将抗海南番木瓜环斑病毒植物表达载体 pCAMBIA2300-35S-CP-RNAi-OCS 转入番木瓜中, 对转 CP 基因番木瓜进行分子特征及抗病毒试验分析, 获得了具有较好的 PRSV 抗性的转基因株系^[33-34]。

在番木瓜中引入 1 个发夹结构来靶向 PRSV Nib, 理论上, 病毒的 RNA 与转基因的 RNA 的靶向方式相同, 从而使植物能够抵抗感染。在本研究中, 描述了通过转化苗进行阳性株系筛选、hiTAIL-PCR 验证特异插入位点以及转基因株系抗性试验, 鉴定了 1 个抗病毒转基因番木瓜 NibB5-2 的基因组插入和侧翼区域, 这在转基因作物的安全性评估和追踪单个转基因事件中非常重要^[45]。转基因植株 NibB5-2 外源基因未插入到番木瓜编码基因中, hiTAIL-PCR 显示插入位点在第 2 号染色体的 supercontig_30 的 1976766 位置, 设计特异引物验证插入位点时发现转基因植株 NibB5-2 为杂合子。转基因植株 NibB5-2 和非转基因植株 NibB5-5 通过田间自然发病试验, 对症状进行视觉评估, 并使用 PRSV (CP) 外壳蛋白引物, 通过 RT-PCR 检测病毒的存在, 结果表明植株 NibB5-2 对由病虫传播的 PRSV 产生了抗性。这是由于转基因番木瓜植株 NibB5-2 体内含有 Nib 发夹插入结构, 转入 Nib 基因反向重复载体转录形成了 dsRNA, 含有 dsRNA 的发夹结构被 dicer 酶识别, 诱导 RNAi 机制的启动^[46], 从而有

效抑制了在田间 PRSV 对番木瓜的危害。在转基因植株 NibB5-2 T₁ 代和非转基因植株 NibB5-5 T₁ 代植株中进行摩擦接种实验, 在接种后, NibB5-2 T₁ 代植株表现出抗性, T₁ 代植株中含有 Nib 发夹插入, 并在大多数情况下表达了该基因, 假设 RNAi 可以诱导植物的病毒防御, 转基因表达水平足够强, 足以引起影响。由双链反向重复序列茎和单链内含子环组成了发夹 RNA (hpRNA), 双链茎决定了反应的特异性是 RNA 沉默的关键因素^[47], 内含子与 RNA 沉默虽然没有直接关系但内含子有利于 hpRNA 的形成, 提高其稳定性, 诱导有效的基因沉默^[48]。当茎长为 200~800 bp 时, 开始出现明显的沉默, 沉默效率高达 60%~80%^[49]。

采用 RNAi 策略获得 PRSV 抗性, 目标基因的小片段可以最大限度地降低重组、转化、协同作用和互补的风险, 且还可避免田间释放和商业化的潜在风险^[50]。含 PRSV-Nib 的转基因番木瓜已遗传到 T₁ 代, 对 PRSV 仍具有抗性, 可进一步用于抗病育种。为获得广谱抗 PRSV 的转基因植株, 还需要通过多代选择, 以此产生更稳定的品系, 未来的工作还需要确定这些转基因植株是否在田间条件和较高温度下保持表达并提供抗性。

参考文献

- [1] ZHU Y J, JIA R. Papaya genome analysis for disease resistance genes and molecular markers in *Carica papaya* and wild relative: *vasconcellea goudotiana*[J]. *Acta Horticulturae*, 2016(1111): 1-6.
- [2] GONSALVES D, VEGAS A, PRASARTSEE V, DREW R, TRIPATHI S. Developing papaya to control *Papaya ringspot virus* by transgenic resistance, intergeneric hybridization, and tolerance breeding[J]. *Plant Breeding Reviews*, 2010, 26: 35-78.
- [3] CHIANG C H, LEE C Y, WANG C H, JAN F J, YEH S D. Genetic analysis of an attenuated *Papaya ringspot virus* strain applied for cross-protection[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2007, 118(4): 333-348.
- [4] FREITAS D M S, REZENDE J A M. Protection between strains of *Papaya ringspot virus*: type w in zucchini squash involves competition for viral replication sites[J]. *Scientia Agricola*, 2008, 65(2): 183-189.
- [5] SHARMA S K, ZOTE K K, KADAM U M, TOMAR S, DHALE M G, SONAWANE A U. Integrated management of *Papaya ringspot virus*[J]. *Acta Horticulturae*, 2010, 851(851): 473-480.

- [6] WESTWOOD J H, STEVENS M. Resistance to aphid vectors of virus disease[J]. *Advances in Virus Research*, 2010, 76: 179-210.
- [7] GROEN S C, WAMONJE F O, MURPHY A M, CARR J P. Engineering resistance to virus transmission[J]. *Current Opinion in Virology*, 2017, 26: 20-27.
- [8] SHARMA S K, TRIPATHI S. *Papaya ringspot virus*-P: overcoming limitations of resistance breeding in *Carica papaya* L[J]. *Plant Virus-Host Interaction*, 2014: 177-194.
- [9] SHARMA S K, TRIPATHI S. Resistance against *Papaya ringspot virus* in vasconcellea species: present and potential uses[J]. *Plant Viruses: Evolution and Management*, 2016: 215-230.
- [10] SHARMA S K, TRIPATHI S, MITRA S K. Breeding for resistance against *Papaya ringspot virus*: history, present status and future prospects in India[J]. *Acta Horticulturae*, 2019(1250): 45-54.
- [11] LINDBO J A, DOUGHERTY W G. Plant pathology and RNAi: a brief history[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2005, 43(1): 191-204.
- [12] VOINNET O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6(3): 206-220.
- [13] LINDBO J A, SILVA-ROSALES L, PROEBSTING W M, DOUGHERTY W G. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance[J]. *Plant Cell*, 1993, 5(12): 1749-1759.
- [14] HAMILTON A J, BAULCOMBE D C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants[J]. *Science*, 1999, 286(5441): 950-952.
- [15] NYKÄNEN A, HALEY B, ZAMORE P D. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway[J]. *Cell*, 2001, 107(3): 309-321.
- [16] BERNSTEIN E, CAUDY A A, HAMMOND S M, HANNON G J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference[J]. *Nature*, 2001, 409(6818): 363-366.
- [17] LINDBO J A, DOUGHERTY W G. Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts[J]. *Virology*, 1992, 189(2): 725-733.
- [18] DAVIS M J, YING Z. Development of papaya breeding lines with transgenic resistance to *Papaya ringspot virus*[J]. *Plant Disease*, 2004, 88(4): 352-358.
- [19] TRIPATHI S, SUZUKI J Y, FERREIRA S A, GONSALVES D. *Papaya ringspot virus*-P: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2008, 9(3): 269-280.
- [20] JIA R, ZHAO H, HUANG J, KONG H, ZHANG Y, GUO J, HUANG Q, GUO Y, WEI Q, ZUO J. Use of RNAi technology to develop a PRSV-resistant transgenic papaya[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 12636.
- [21] JAN F J, FAGOAGA C, PANG S Z, GONSALVES D. A single chimeric transgene derived from two distinct viruses confers multi-virus resistance in transgenic plants through homology-dependent gene silencing[J]. *Journal of General Virology*, 2000, 81: 2103-2109.
- [22] DOUGHERTY W G, LINDBO J A, SMITH H A, PARKS T D, PROEBSTING W M. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation[J]. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 1994, 7(5): 544-552.
- [23] SHARMA S K, TRIPATHI S. Chapter 9 - *Papaya ringspot virus*-P: overcoming limitations of resistance breeding in *Carica papaya* L.[M]//GAUR R K, SHARMA P, HOHN T. *Plant virus-host interaction*. London: Academic Press, 2014: 177-194.
- [24] WINTERMANTEL W M, ZAITLIN M. Transgene translatability increases effectiveness of replicase-mediated resistance to *Cucumber mosaic virus*[J]. *Journal of General Virology*, 2000, 81: 587-595.
- [25] SHUANG Z, HAO X. High level resistance to TuMV (*Turnip mosaic virus*) in transgenic mustard with the antisense *NiB* gene of the virus[C]. *International Conference on Computational and Information Sciences*, 2010: 1080.
- [26] YANG X, NIU L, ZHANG W, HE H, YANG J, XING G, GUO D, DU Q, QIAN X, YAO Y, LI Q, DONG Y. Robust RNAi-mediated resistance to infection of seven potyvirids in soybean expressing an intron hairpin *NiB* RNA[J]. *Transgenic Research*, 2017, 26(5): 665-676.
- [27] SIVAMANI E, BREY C W, DYER W E, TALBERT L E, QU R. Resistance to wheat streak mosaic virus in transgenic wheat expressing the viral replicase (*NiB*) gene[J]. *Molecular Breeding*, 2000, 6(5): 469-477.
- [28] TATINENI S, SATO S, NERSESIAN N, ALEXANDER J, CLEMENTE T. Transgenic wheat harboring an RNAi element confers dual resistance against synergistically interacting wheat streak mosaic virus and triticum mosaic virus[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2019, 33(1): 108-122.
- [29] JONES A L, JOHANSEN I E, BEAN S J, BACH I, MAULE A J. Specificity of resistance to pea seed-borne mosaic potyvirus in transgenic peas expressing the viral replicase (*NiB*) gene[J]. *The Journal of General Virology*, 1998, 79: 3129-3137.
- [30] YOON J, FANG M, LEE D, PARK M, KIM K-H, SHIN C. Double-stranded RNA confers resistance to pepper mottle virus in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Applied Biological Chemistry*, 2021, 64(1): 1.
- [31] ZHANDONG Y, SHUANGYI Z, QIWEI H. High level resistance to *Turnip mosaic virus* in Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson) transformed

- with the antisense *Nlb* gene using marker-free *Agrobacterium tumefaciens* infiltration[J]. *Plant Science*, 2007, 172(5): 920-929.
- [32] ZHAO H, JIA R Z, ZHANG Y L, ZHU Y J, ZENG H C, KONG H, MCCAFFERTY H, GUO A P, PENG M. Geographical and genetic divergence among *Papaya ringspot virus* populations within Hainan province, China[J]. *Phytopathology*, 2016, 106(8): 937-944.
- [33] 黄静, 贾瑞宗, 孔华, 郭静远, 王绪朋, 郭安平. 基于 RNAi 抗 PRSV 番木瓜株系的培育及其分子特征验证[J]. *热带作物学报*, 2017, 38(3): 513-520.
HUANG J, JIA R Z, KONG H, GUO J Y, WANG X P, GUO A P. Breeding and molecular characterisation of RNAi papaya for resistance of *Papaya ringspot Virus* [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2017, 38(3): 513-520. (in Chinese)
- [34] 赵辉. 利用 RNAi 技术创制高效广谱抗环斑病毒番木瓜新种质[D]. 海口: 海南大学, 2016.
ZHAO H. The acquisition of the high efficient and broad-spectrum *Papaya ringspot virus* resistant transgenic papaya by exploiting the RNAi technology[D]. Haikou: Hainan University, 2016. (in Chinese)
- [35] LIU Y G, CHEN Y. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences[J]. *Biotechniques*, 2007, 43(5): 649-650.
- [36] 陈红运, 黄峰, 陈青, 方志鹏, 黄文胜. 应用 *hTAIL*-PCR 扩增转基因木瓜的侧翼序列[J]. *植物检疫*, 2018, 32(5): 24-27.
CHEN H Y, HUANG F, CHEN Q, FANG Z P, HUANG W S. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of flanking sequence of transgenic papaya lines[J]. *Plant Quarantine*, 2018, 32(5): 24-27. (in Chinese)
- [37] YU R, CHEN C, CAO W, LIU H, ZHOU S, SONG Y, ZHU C. High-degree and broad-spectrum resistance mediated by a combination of *Nlb* siRNA and miRNA suppresses replication of necrotic and common strains of *Potato virus Y*[J]. *Archives of Virology*, 2018, 163(11): 3073-3081.
- [38] 张雨良, 黄启星, 郭安平, 曾会才, 赵辉, 孔华, 刘志昕. 海南番木瓜 PRSV 和 PLDMV 病毒发生情况及分子鉴定[J]. *热带作物学报*, 2013, 34(12): 2436-2411.
ZHANG Y L, HUANG Q X, GUO A P, ZENG H C, ZHAO H, KONG H, LIU Z X. Occurrence and distribution of *Papaya ring spot virus* and *Papaya leaf-distortion mosaic virus* in Hainan province[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2013, 34(12): 2436-2411. (in Chinese)
- [39] CASTILLO X, FERMIN G, TABIMA J, ROJAS Y, TENNANT P F, FUCHS M, SIERRA R, BERNAL A J, RESTREPO S. Phylogeography and molecular epidemiology of *Papaya ringspot virus*[J]. *Virus Research*, 2011, 159(2): 132-140.
- [40] MUELLER E, GILBERT J, DAVENPORT G, BRIGNETI G, BAULCOMBE D C. Homology-dependent resistance: transgenic virus resistance in plants related to homology-dependent gene silencing[J]. *The Plant Journal*, 1995, 7(6): 1001-1013.
- [41] HOLEN T, AMARZGUIOUI M, WIIGER M T, BABAIE E, PRYDZ H. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger tissue factor[J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(8): 1757-1766.
- [42] OLIVER P, DANIEL B, REBECCA S, FRED L, LYNNE T, BHARAT R. Nucleotide sequence homology requirements of HIV-1-specific short hairpin RNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003(22): 6444-6449.
- [43] BALMORIMELIAN E, MACDIARMID R M, BECK D L, GARDNER R C, FORSTER R. Sequence-, tissue-, and delivery-specific targeting of RNA during post-transcriptional gene silencing[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2007, 15(8): 753-763.
- [44] SONODA S, MORI M, NISHIGUCHI M. Homology-dependent virus resistance in transgenic plants with the coat protein gene of sweet potato feathery mottle potyvirus: target specificity and transgene methylation[J]. *Phytopathology*, 1999, 89(5): 385.
- [45] YANG L, WANG C, HOLST-JENSEN A, MORISSET D, LIN Y, ZHANG D. Characterization of GM events by insert knowledge adapted re-sequencing approaches[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3(1): 2839.
- [46] HELLIWELL C A, WATERHOUSE P M. Constructs and methods for hairpin RNA-mediated gene silencing in plants[J]. *Methods in Enzymology*, 2005, 392: 24-35.
- [47] WESLEY S V, HELLIWELL C A, SMITH N A, WANG M B, ROUSE D T, LIU Q, GOODING P S, SINGH S P, ABBOTT D, STOUTJESDIJK P A, ROBINSON S P, GLEAVE A P, GREEN A G, WATERHOUSE P M. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants[J]. *The Plant Journal*, 2001, 27(6): 581-590.
- [48] 李鹏, 宋云枝, 刘晓玲, 朱常香, 温孚江. 马铃薯 Y 病毒 CP 基因 5'端和 3'端反向重复结构介导的抗病性研究[J]. *植物病理学报*, 2007(1): 69-76.
LI P, SONG Y Z, LIU X L, ZHU C X, WEN F J. Study of virus resistance mediated by inverted repeats derived from 5' and 3' ends of coat protein gene of *Potato virus Y*[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2007(1): 69-76. (in Chinese)
- [49] CHEN X, LIU J, XU L, JIANG F, XIE X, ZHU C, WEN F. Inhibiting virus infection by RNA interference of the eight functional genes of the *Potato virus Y* genome[J]. *Journal of Phytopathology*, 2010, 158: 776-784.
- [50] XU L, SONG Y, ZHU J, GUO X, ZHU C, WEN F. Conserved sequences of replicase gene-mediated resistance to potyvirus through RNA silencing[J]. *Journal of Plant Biology*, 2009, 52(6): 550.