

吴磊, 姜朋, 张瑜, 等. 苏麦3号小麦穗部病毒诱导的基因沉默(VIGS)体系的建立及验证[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(2): 248-252.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.02.002

苏麦3号小麦穗部病毒诱导的基因沉默(VIGS)体系的建立及验证

吴磊, 姜朋, 张瑜, 马鸿翔, 张旭

(江苏省农业科学院农业生物技术研究所/江苏省农业生物学重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 为了探讨利用病毒诱导的基因沉默(VIGS)体系在小麦穗部进行基因沉默的可行性, 用大麦条纹花叶病毒诱导苏麦3号小麦穗部 *PDS* 基因的转录后沉默, 再接种禾谷镰刀菌进行抗性鉴定。结果表明, 与接种空载 BSMV:00 的对照相比, 接种 BSMV: *PDS* 的小麦穗中 *PDS* 基因表达量下调了 77% ($P < 0.05$)。接种 BSMV:00 的小麦穗受到赤霉病菌侵染后, 穗部平均病小穗数和 DON 毒素含量分别为 2.75 个和 4.55 $\mu\text{g/g}$, 与接种无菌水对照无显著差异 ($P > 0.05$)。说明在苏麦3号穗部 VIGS 系统中, 通过接种病毒能使靶标基因沉默; 接种赤霉病菌后, 苏麦3号病小穗数和 DON 毒素含量不受接种病毒的影响, 对赤霉病菌的抗性保持不变, 建立的 VIGS 体系可以应用于小麦赤霉病抗性候选基因的功能分析。

关键词: 小麦; 赤霉病抗性; 病毒诱导的基因沉默(VIGS)

中图分类号: S512.103.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2017)02-0248-05

Construction and validation of virus-induced gene silencing(VIGS) system in spike of wheat variety Sumai 3

WU Lei, JIANG Peng, ZHANG Yu, MA Hong-xiang, ZHANG Xu

(Institute of Agricultural Biotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Provincial Key Laboratory of Agrobiotechnology, Nanjing 210014, China)

Abstract: Virus-induced gene silencing (VIGS) was performed in the spikes of wheat variety Sumai3 by constructing VIGS vectors and silencing *PDS*, in order to explore the feasibility of gene silencing by VIGS system in spikes of wheat. The results showed that the expression level of *PDS* in the spikes inoculated by barley stripe mosaic virus (BSMV): *PDS* was reduced by 77% in comparison with that by BSMV:00 ($P < 0.05$). After infection with *Fusarium asiaticum*, the average number of diseased spikelets and DON content were 2.75 and 4.55 $\mu\text{g/g}$, respectively, showing no significant difference with the control group ($P > 0.05$). The results suggested that the VIGS system for spike enabled the target gene silencing. The number of diseased spikelets and accumulation of DON toxin in Sumai 3 were not affected by the virus inoculation, and the FHB resistance remained unchanged, indicating that the VIGS system for Sumai3 could be applied to functional analysis of candidate genes for wheat FHB resistance.

Key words: wheat; resistance to FHB; virus-induced gene silencing

收稿日期: 2016-07-19

基金项目: 江苏省农业生物学重点实验室项目(49114042014Z012);

国家公益性行业专项(201303016); 江苏省重点研发项目
(BE2013439, BE2015352)

作者简介: 吴磊(1986-), 男, 湖北仙桃人, 博士, 助理研究员, 研究方向为小麦抗赤霉病的分子机理和遗传育种。(Tel) 025-84390293; (E-mail) wulei686@sina.com

通讯作者: 张旭, (E-mail) xuzhang@jaas.ac.cn

大麦条纹花叶病毒(Barley stripe mosaic virus, BSMV)诱导的基因沉默(Virus-induced gene silencing, VIGS)技术是通过构建靶标基因反向片段的重组病毒侵染植物, 导致靶标基因局部双链 RNA 的形成, 从而引发靶标基因的转录后沉默^[1]。八氢番

茄红素脱氢酶(PDS)为植物中类胡萝卜素合成途径的限速酶,沉默后产生漂白表型,常作为VIGS体系中的指示基因^[2]。叶部VIGS体系已在禾本科植物中被广泛应用于抗病基因如抗叶锈病^[3]、抗白粉病^[4]和抗黄矮病^[5]等相关基因功能的初步分析。

赤霉病(Fusarium head blight, FHB)是中国小麦的主要病害之一,严重影响小麦的产量和品质^[6-8]。在中国长江中下游冬麦区和东北春小麦区大面积发生,在一般流行年份可引起5%~10%的产量损失,大流行年份可导致绝收^[9]。此外,病麦粒携带的真菌毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Deoxynivalenol, DON)影响种子质量,危害人和动物的健康,成为威胁粮食安全的隐患之一^[6,10]。

小麦苏麦3号是公认的赤霉病抗性材料^[11],其3B染色体短臂上的抗性QTL位点*Fhb1*^[12]、6BS短臂上的抗扩展位点*Fhb2*^[13]和5A染色体短臂上的抗侵染位点*Qfhs.ifa-5A*^[14]是重现性最好的主效位点。小麦基因组部分序列、EST库和预测的基因序列已经发表^[15],利用稳定、高效的苏麦3号穗部VIGS体系可以快速鉴定抗性候选基因的功能,同时也是解析小麦赤霉病抗性分子机制及进行抗性遗传改良的前期基础和关键步骤。

本研究用BSMV诱导苏麦3号小麦穗部PDS基因转录后沉默,接种禾谷镰刀菌进行抗性鉴定,以验证在苏麦3号穗部利用VIGS体系进行基因沉默的可行性,为研究小麦抗赤霉病的基因功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

抗赤霉病小麦品种苏麦3号、强致病力小麦赤霉病菌株F0609由本课题组保存,小麦种植于植物人工气候室。基因沉默载体为BSMV:α、BSMV:β、BSMV:PDS,由南京农业大学王秀娥教授惠赠。RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems-SP6 and T7和Ribo m7G Cap Analog购自Promega公司,质粒小量提取试剂盒购自Axygen公司,限制性内切酶*Nhe*I、*Mlu*I、*Spe*I购自Thermo scientific公司,DON毒素检测试剂盒(产品编号:HE09012)购自北京华安麦科生物技术有限公司。

1.2 VIGS载体的线性化与体外转录

BSMV:PDS用限制性内切酶*Nhe*I完全酶切,酶切体系为载体200 ng、10×Buffer 2 μl、*Nhe*I酶1

μl, ddH₂O补足至20 μl,37℃酶切2 h,回收载体片段,利用T4连接酶自连后转化大肠杆菌,提取质粒,命名为BSMV:00。使用Nanodrop微量核酸定量仪对质粒进行定量。将BSMV:α、BSMV:PDS和空质粒BSMV:00使用*Mlu*I进行线性化,BSMV:β使用*Spe*I进行线性化。酶切体系为:质粒2 μg, 10×Buffer 5 μl,酶2 μl,DEPC水补足至50 μl。37℃酶切过夜后回收纯化。按照RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems-SP6 and T7说明书进行线性化片段的体外转录,反应体系为:T7 Transcription 5×Buffer 4.0 μl, γNTPs 6.0 μl, 线性化质粒1 μg, Ribo m7G Cap Analog 1.5 μl, Enzyme Mix (T7) 2.0 μl, DEPC水补足至20.0 μl。BSMV:α、BSMV:β、BSMV:00和BSMV:PDS的转录产物经过定量后等体积混合,于抽穗期前7~10 d接种小麦旗叶,接种方法采用摩擦接种方法,每种处理接种10片旗叶,以无菌水接种为对照。

1.3 赤霉病抗性鉴定

采用单花滴注法^[16]进行小麦赤霉病的抗性鉴定。培养强致病力小麦赤霉病菌F0609分生孢子液(1 ml 5×10⁵个分生孢子),将分生孢子液滴注到扬花初期麦穗中部的2朵小花中,每个处理3~5穗。塑料袋套袋保湿3 d后,每天喷DEPC水雾3~4次,以达到保湿效果。接种病原菌后14 d调查接种麦穗的病小穗数。

1.4 基因相对表达量分析

取接种病毒后14 d的小穗,使用Promega植物总RNA提取试剂盒提取植物总RNA,使用TaKaRa反转录试剂盒合成cDNA第一链。利用Roche LightCycler96实时荧光定量PCR仪检测目的基因表达量,目的基因定量引物为qPDSF(5'-GCTTGG-TATTAGTGATCGCTTGC-3')、qPDSR(5'-ACGGCTG-TATTCTCCTGGTTTG-3')。内参基因为*Tubulin*,其引物序列为qTublinF(5'-GTGGAACTGGCTCTGGC-3')、qTublinR(5'-CGCTCAATGTCAAGGGA-3')。反应体系20 μl,含cDNA 100 ng、正反引物5 nmol/L、2×SYBR Premix Ex Taq 10 μl。反应程序为95℃ 2 min;95℃ 15 s,60℃ 31 s,30个循环。采用2^{-ΔΔC_t}法对目的基因进行相对定量表达分析。

1.5 DON毒素含量的测定

取接种赤霉病菌后21 d病穗,粉碎后取5 g样品置于100 ml具塞三角瓶中,加入50 ml去离子水,

混合。于振荡器上剧烈振荡 10 min, 转速为 150 r/min; 取液体于 4 000 r/min 离心 5 min。取上清 1 ml, 再加入 4 ml 去离子水。取 50 μ l, 采用北京华安麦科生物技术有限公司的呕吐毒素 (DON) ELISA 快速检测试剂盒测定 DON 含量。

2 结果与分析

2.1 VIGS 载体的线性化和体外转录

用限制性内切酶 *Nhe* I 完全酶切 BSMV : *PDS*,

回收自连后获得空质粒 BSMV : 00 (图 1-A)。将 VIGS 载体 BSMV : α 、BSMV : β 、BSMV : *PDS* 和空质粒 BSMV : 00 酶切线性化 (图 1-B)。再将线性化产物进行体外转录, 获得 BSMV 体外转录产物 BSMV : α 、BSMV : β 、BSMV : *PDS* 和 BSMV : 00 (图 1-C)。

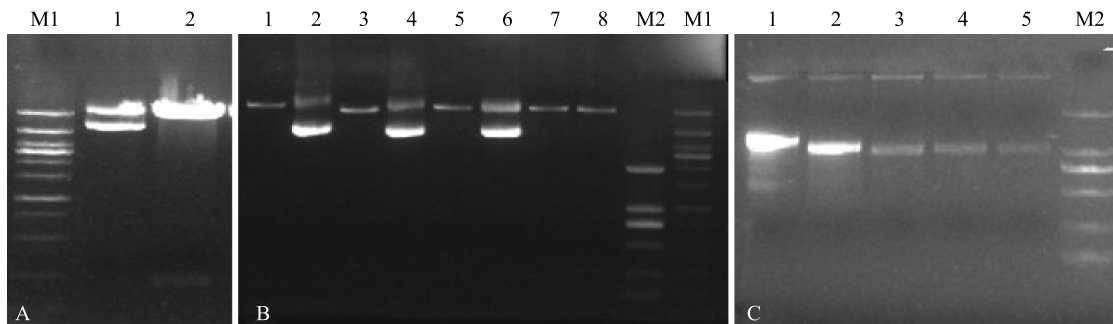


图 1 VIGS 载体的线性化和体外转录
A 中, 1 为未酶切 BSMV : *PDS*, 2 为质粒 BSMV : 00; B 中, 1、3、5 和 7/8 分别为线性化的 BSMV : α 、BSMV : β 、BSMV : *PDS* 和 BSMV : 00, 2、4 和 6 为未线性化质粒; C 中, 1、2、3 和 4/5 分别为 BSMV : α 、BSMV : β 、BSMV : *PDS* 和 BSMV : 00。M₁: Wide range DNA marker; M₂: DNA maker DL2000。

图 1 VIGS 载体的线性化和体外转录

Fig.1 Linearization and *in vitro* transcription of VIGS vectors

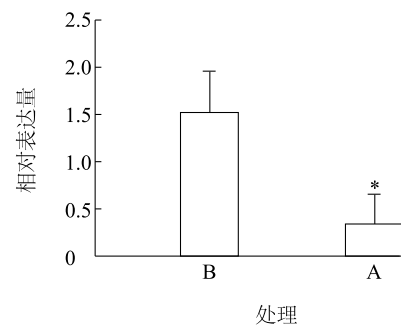
2.2 接种病毒后苏麦 3 号 *PDS* 基因相对表达量

等量混合 BSMV : α 、BSMV : β 、BSMV : *PDS* 或 BSMV : 00 后进行病毒接种。接种病毒后 14 d, 对苏麦 3 号穗部中 *PDS* 基因相对表达量进行检测, 结果显示与空载体 BSMV : 00 相比 *PDS* 表达量下调了 77%, 差异显著 ($P < 0.05$) (图 2)。这表明接种病毒后, 苏麦 3 号穗部中 *PDS* 基因的表达被沉默。

2.3 接种病毒后苏麦 3 号对赤霉病菌的抗性

在苏麦 3 号扬花期, 即接种病毒后 14~20 d 时接种赤霉病菌, 鉴定 VIGS 系统中接种病毒后苏麦 3 号对赤霉病菌的抗性。结果表明, 接种 BSMV : *PDS* 后, 苏麦 3 号穗部产生漂白现象 (图 3-A), 说明 VIGS 体系能使靶标基因产生沉默; 接种病毒 BSMV : 00 的麦穗受到赤霉病菌感染后形成病斑, 接种无菌水的对照苏麦 3 号对赤霉病菌的抗性不变 (图 3-B、C)。

接种病毒 BSMV : 00 的麦穗受到赤霉病菌感染



A: 接种 BSMV : *PDS*; B: 接种 BSMV : 00。

图 2 接种病毒后苏麦 3 号穗部 *PDS* 基因的表达量

Fig.2 Expression level of *PDS* gene in wheat Sumai3 spikes after virus inoculation

后穗部平均病小穗数为 2.75 个, 接种无菌水的对照为 2.50 个, 无显著差异 ($P > 0.05$) (图 4); 病小穗中 DON 毒素含量为 4.55 μ g/g, 与对照无显著差异 ($P > 0.05$) (图 5)。说明在苏麦 3 号穗部 VIGS 系统中, 接种病毒能使靶标基因沉默, 而且苏麦 3 号病小

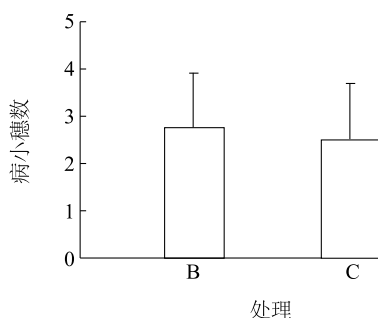


A:接种 BSMV : *PDS*;B:接种 BSMV : 00;C:接种无菌水。

图 3 接种病毒后苏麦 3 号对禾谷镰刀菌的抗性

Fig.3 Resistance to *Fusarium asiaticum* in wheat Sumai 3 after virus inoculation

穗数和 DON 毒素积累不受病毒的影响,建立的 VIGS 体系可以应用于小麦赤霉病抗性候选基因的功能分析。



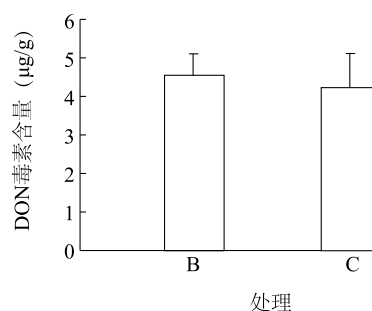
B:接种 BSMV : 00;C:接种无菌水。

图 4 接种病毒和赤霉病菌后苏麦 3 号病小穗数

Fig.4 Number of diseased spikelets in wheat Sumai 3 after virus and *Fusarium asiaticum* inoculation

3 讨论

基因 *PDS* 的有效沉默是验证植物 VIGS 体系正常运转的重要标志之一。有研究结果表明小麦品种新春 11 的穗部 *PDS* 沉默后,在接种病毒后 9 d 表达量下降 40%,接种病毒后 15 d 表达量下调超过 60%,说明小麦内源 *PDS* 被有效沉默,证实了 VIGS 体系在小麦穗部沉默靶基因的有效性^[17]。病程相



B:接种 BSMV : 00;C:接种无菌水。

图 5 接种病毒和赤霉病菌后苏麦 3 号穗部 DON 毒素含量

Fig.5 Content of DON in wheat Sumai3 spikes after virus and *Fusarium asiaticum* inoculation

关蛋白(Pathogenesis-related 1)基因(*TaPRI*)在水杨酸应答途径中起重要作用,在小麦 Fielder 穗部中对 *PDS*、*TaPRI* 等基因沉默后,通过分析病小穗数、种子表型、DON 毒素含量,发现利用 VIGS 体系分析赤霉病抗性基因的功能是可行的^[18]。病毒诱导的基因沉默在植物基因功能研究中应用非常广泛,在对靶标基因沉默的基础上结合表型分析可以快速地分析靶标基因的功能。通过 VIGS 介导 *TaFROG*^[19]、*TaABCC3*^[20] 沉默后,表达水平下降,病小穗数升高,对 DON 毒素的耐受能力下降,这表明 *TaFROG*、*TaABCC3* 在小麦耐 DON 毒素过程中具有功能。本研究中,在苏麦 3 号穗部接种 BSMV : *PDS* 后,形成不均匀的漂白斑,可能是由于病毒侵染的不均匀造成的,在漂小白穗中 *PDS* 基因相对表达量在接种后 14 d 下调 77%,这表明在苏麦 3 号穗部 VIGS 体系中对靶标基因进行沉默同样也是有效的。

解析小麦赤霉病抗性遗传机制和明确抗病基因功能对小麦赤霉病抗性遗传改良、产量提高和保障粮食安全都具有重要意义。结合遗传分析、组学研究和基因组序列比对等研究手段,已发掘出大量小麦赤霉病抗性候选基因^[21-22]。这些候选基因分布在小麦应答禾谷镰刀菌的各个生物学过程中,如初级和次级代谢生物合成^[23]、细胞壁防御^[24]、茉莉酸应答途径^[25]和转化毒素^[26]等,但大多数都未进行深入的基因功能验证研究。本研究建立的苏麦 3 号穗部 VIGS 体系可以应用于小麦赤霉病抗性候选基因的功能分析,为解析小麦赤霉病抗性的分子机理奠定了基础。

致谢: 衷心感谢南京农业大学农学院王秀娥

教授和肖进博士对 VIGS 的技术支持与实验指导!

参考文献:

- [1] 李森森,南富波,刘伟,等. VIGS 技术在禾本科植物中的应用研究进展[J]. 麦类作物学报, 2013,33(2):401-406.
- [2] KUMAGAI M H, DONSON J, DELLA-CIOPPA G, et al. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995,92(5):1679-1683.
- [3] SCOFIELD S R, HUANG L, BRANDT A S, et al. Development of a virus-induced gene-silencing system for hexaploid wheat and its use in functional analysis of the Lr21-mediated leaf rust resistance pathway[J]. Plant Physiology, 2005,138(4):2165-2173.
- [4] VÁRALLYAY E, GICZEY G, BURGÝÁN J. Virus-induced gene silencing of *Mlo* genes induces powdery mildew resistance in *Triticum aestivum*[J]. Archives of Virology, 2012, 157(7): 1345-1350.
- [5] 赵丹,赵继荣,黄茜,等. 利用 BSMV-VIGS 技术快速分析小麦 *TNBL1* 基因的抗黄矮病功能[J]. 作物学报, 2011,37(11):2106-2110.
- [6] 陆维忠,程顺和,王裕中. 小麦赤霉病研究[M]. 北京:科学出版社, 2001.
- [7] 徐云,高苹,缪燕,等. 江苏省小麦赤霉病气象条件适宜度判别指标[J]. 江苏农业科学, 2016,44(8):188-192.
- [8] 段成鼎,任兰柱,范建芝,等. 种子包衣结合扬花期喷雾对小麦赤霉病防治效果研究[J]. 山东农业科学, 2015,47(6):104-106.
- [9] 程顺和,张勇,别同德,等. 中国小麦赤霉病的危害及抗性遗传改良[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(5):938-942.
- [10] 马鸿翔,陆维忠. 小麦赤霉病抗性改良研究进展[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(1):197-203.
- [11] BUERSTMAYER H, BAN T, ANDERSON J A. QTL mapping and marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat: a review[J]. Plant Breeding, 2009, 128:1-16.
- [12] LIN F, KONG Z X, ZHU H L, et al. Mapping QTL associated with resistance to *Fusarium* head blight in the Nanda2419/Wangshuibai population. I. Type II resistance[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109:1504-1511.
- [13] WALDRON B L, MORENO-SEVILLA B, ANDERSON J A, et al. RFLP mapping of QTL for *Fusarium* head blight resistance in wheat[J]. Crop Science, 1999, 39:805-811.
- [14] BUERSTMAYER H, LEMMENS M, HARTL L, et al. Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (type II resistance)[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 104:84-91.
- [15] CHOLET F, ALBERTI A, THEIL S, et al. Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B[J]. Science, 2014, 345(6194):1249721.
- [16] 张旭,任丽娟,谭秀云,等. 利用分子标记研究小麦遗传群体的赤霉病抗性鉴定方法[J]. 南京大学学报, 2005,41(2):125-132.
- [17] 南富波,李森森,王昊龙,等. 小麦 *PDS* 基因 VIGS 载体构建体系的优化及验证[J]. 麦类作物学报, 2014,34(3):285-291.
- [18] BUHROW L M, CLARK S M, LOEWEN M C. Identification of an attenuated barley stripe mosaic virus for the virus-induced gene silencing of pathogenesis-related wheat genes[J]. Plant Methods, 2016 12:12. DOI 10.1186/s13007-016-0112-z.
- [19] ALEXANDRE P, JIA J G, AMAL K, et al. TaFROG encodes a *Pooideae* orphan protein that interacts with SnRK1 and enhances resistance to the mycotoxigenic fungus *Fusarium graminearum*[J]. Plant Physiology, 2015, 169:2895-2906.
- [20] WALTER S, KAHLA A, ARUNACHALAM C, et al. A wheat ABC transporter contributes to both grain formation and mycotoxin-tolerance[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(9):2583-2593.
- [21] WALTER S, NICHOLSON P, DOOHAN F. Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease[J]. New Phytologist, 2010, 185:54-66.
- [22] KAZAN K, GARDINER D M, MANNERS J M. On the trail of a cereal killer: recent advances in *Fusarium graminearum* pathogenesis and host resistance[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(4):399-413.
- [23] NUSSBAUMER T, WARTH B, SHARMA S, et al. Joint transcriptomic and metabolomic analyses reveal changes in the primary metabolism and imbalances in the subgenome orchestration in the bread wheat molecular response to *Fusarium graminearum*[J]. Genes Genomes Genetics, 2015, 5:2579-2592.
- [24] GUNNAIAH R, KUSHALAPPA A C, DUGGAVATHI R, et al. Integrated metabolite-proteomic approach to decipher the mechanisms by which wheat QTL(*Fhb1*) contribute to resistance against *Fusarium graminearum*[J]. PLOS One, 2012, 7(7): e40695. DOI:10.1371/journal.pone.0040695
- [25] XIAO J, JIN X, JIA X, et al. Transcriptome-based discovery of pathways and genes related to resistance against *Fusarium* head blight in wheat landrace Wangshuibai[J]. BMC Genomics, 2013, 14:197.
- [26] SCHWEIGER W, STEINER B, AMETZ C, et al. Transcriptomic characterization of two major *Fusarium* resistance quantitative trait loci (QTLs), *Fhb1* and *Qfhs.ifa-5A*, identifies novel candidate genes[J]. Molecular Plant Pathology, 2013,14(8):772-785.

(责任编辑:张震林)