

南方水稻黑条矮缩病毒 S9 基因 RNA 干涉载体的构建

袁斌^{1,2,3}, 张舒^{1,2,3}, 吕亮^{1,2,3}

(1. 湖北省农业科学院植保土肥研究所, 湖北武汉 430064; 2. 农业部华中作物有害生物综合治理重点实验室, 湖北武汉 430064; 3. 农作物重大病虫害草害防控湖北省重点实验室, 湖北武汉 430064)

摘要 [目的] 构建抗南方水稻黑条矮缩病毒(Southern Rice Black-Streaked Dwarf Virus)的 RNA 干涉载体。[方法] 通过 PCR 扩增、克隆并测序获得 SBRSDV 病毒 S9 基因的 703 bp 片段, 与其他地方分离物 S9 序列的同源性高达 99%, 将此片段连接至 pDS1301 上, 并对阳性克隆进行菌落 PCR、酶切等验证。[结果] 成功构建了可以用于转化水稻产生转基因植株的抗 SBRSDV 病毒的 RNAi 载体。[结论] 利用 SBRSDV 病毒 S9 基因的部分片段构建了 pDS1301-S9 RNA 双链干涉载体, 为创建水稻抗 SBRSDV 新种质奠定了基础。

关键词 南方水稻黑条矮缩病; RT-PCR; 外壳蛋白; RNAi

中图分类号 S511 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)34-12048-03

Construction of RNA Silencing Expression Vectors for S9 of Southern Rice Black-Streaked Dwarf Virus

YUAN Bin^{1,2,3}, ZHANG Shu^{1,2,3}, LV Liang^{1,2,3} (1. Institute of Plant Protection and Soil Fertilizer, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan, Hubei 430064; 2. Key Laboratory of Integrated Management of Crops of Central China, Ministry of Agriculture, Wuhan, Hubei 430064; 3. Hubei Key Laboratory of Crop Disease, Insect Pests and Weeds Control, Wuhan, Hubei 430064)

Abstract [Objective] Construction of RNA silencing expression vectors resistant to Southern Rice Black-Streaked Dwarf Virus. [Method] A 703-bp fragment of S9 gene of SRBSDV was produced through PCR amplification, cloned and sequenced. The results show that the S9 gene identity is as high as 99%. The fragment was cloned into RNAi vector pDS1301. The positive clones were detected by PCR, enzyme digestion. [Result] The experimental results showed that RNAi vector resistant to SRBSDV was constructed successfully. [Conclusion] The vector of pDS1301-S9 by using part of the S9 gene fragments was constructed for SBRSDV virus, the result laid a foundation for creating the rice new germplasm of resistance to SBRSDV.

Key words Southern Rice Black-Streaked Dwarf Virus; RT-PCR; Coat protein; RNAi

2001 年广东阳西县首次发现一种新的水稻病毒病, 将其命名为南方水稻黑条矮缩病(SRBSDV)^[1]。该病严重危害水稻, 还可危害其他禾本科作物; 发展速度快; 病毒由迁飞性害虫白背飞虱为主要传毒媒介, 且传毒效率非常高。SRBSDV 迅速上升成为湖北省水稻生产的主要病害之一。

目前, 利用抗(耐)病毒病和介体的品种是防治植物病毒最经济、简便而有效的措施, 但抗病(虫)的抗源较少。生物工程技术在创建抗病毒材料上起着重要作用。自 1986 年首次将烟草花叶病毒(Tabacco Mosaic Virus, TMV)的 CP 基因转入烟草以来^[2], 马铃薯 X 病毒(Potato Virus X, PVX)、黄瓜花叶病毒(Cucumber Mosaic Virus, CMV)和马铃薯 Y 病毒(Potato Virus Y, PVY)等多种病毒的 CP 蛋白被转移进入相应的植物体中产生新的抗病种质。还有利用病毒复制酶和运动蛋白(Movement Protein, MP)基因介导的抗病性^[3-6]。

随着分子生物学技术的进步, 以病毒基因组序列为靶位点来进行 RNAi, 抑制病毒的复制与表达以达到抗病毒病的目的手段出现, 抗病效果表现得更为高效。这种由 dsRNA 介导的序列特异性的转录后基因沉默(Post-Transcriptional Gene Silencing, PTGS), 在植物抗病毒的研究中具有广阔的前景。目前, 我国还没有鉴定出抗该病的水稻品种, 也未见有 RNAi 创建出抗病新种质的报道。笔者使用在水稻成熟使用的双元载体 pDS1301 构建 SRBSDV 病毒沉默载体, 以期通过转基因的方式创建水稻抗 SRBSDV 新种质。

基金项目 湖北省自然科学基金项目(2011CDB118); “十二五”农村领域国家科技计划课题(2012BAD19B03); 湖北省农业科技创新中心项目。

作者简介 袁斌(1970-), 男, 江西宜春人, 副研究员, 博士, 从事分子植物病理学研究。

收稿日期 2014-10-23

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料。2010 年从武汉、鄂州、崇阳等地采集水稻疑似病株进行检测。湖北崇阳发病田块的水稻病株用于克隆 SRBSDV 病毒的 S9 基因片段。

1.1.2 试剂与载体。pGEM-GZ 载体是利用 pGEM-T 改造, 在 *Bam*H I 的外侧添加有 *Sac* I 位点, *Kpn* I 的外侧添加有 *Spe* I 位点, 以方便扩增产物的克隆和双链 RNAi 载体的构建。*Taq* DNA 合成酶、dNTP 和限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司; 质粒抽提和胶回收试剂盒也购自 TaKaRa 公司; PCR 引物由 Invitrogen 公司合成。用于构建 RNA 干涉的载体 pDS1301 来自华中农业大学作物遗传国家重点实验室^[7]。

1.2 方法

1.2.1 湖北省水稻 SRBSDV 疑似病株的检测。根据文献提供的检测 SRBSDV 和 RBSDV 的特异引物序列合成引物^[8-9], 采用 RT-PCR 技术检测, SRBSDV 的特异引物对为 S10F 和 S10R, RBSDV 的特异引物对为 RS10-F 和 RS10-R (表 1)。利用湖北省各地水稻疑似病株抽提总 RNA, 用随机引物将总 RNA 反转录为 cDNA 作为模板, 分别以 S10F 和 S10R、RS10-F 和 RS10-R 为引物对进行扩增检测样品的病原体。PCR 反应体系: 10 × PCR 反应缓冲液 2 μl, 2.5 mmol 的混合 dNTP 2 μl, 25 mmol 的 MgCl₂ 2 μl, *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μl, 10 μmol/L 上游引物 0.5 μl, 10 μmol/L 下游引物 0.5 μl, 模板 0.5 μl, 加 ddH₂O 至 20 μl。PCR 反应参数: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

1.2.2 SRBSDV 病毒 S9 片段的获取。利用 S9iF 和 S9iR 引物对扩增 S9 基因的片段(表 1)。采用 RT-PCR 技术扩增得

到 SRBSDV 病毒 CP 和 S9 基因的各个片段。将扩增得到的产物挖胶回收,克隆到 pGEM-GZ 载体上,送公司测序验证。将获得的 S9 基因片段阳性克隆命名为 S9-pGEM。

1.2.3 SRBSDV 病毒 S9 基因的生物信息学分析。将获得的 S9 基因序列在 NCBI 上作 Blast 分析,并比较其与其他地区 S9 基因之间的同源性。用 ClustalW 进行 DNA 和氨基酸的多序列比对,确认差异位点,并进行进化分析。

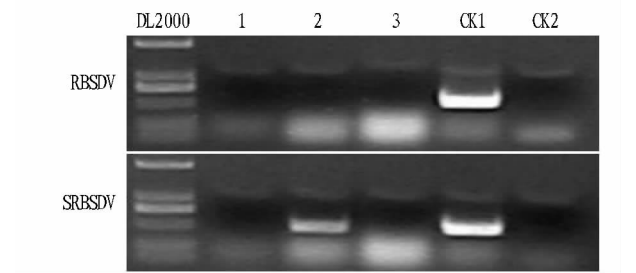
表 1 用于检测 SRBSDV 及构建载体的引物序列		
引物名称	引物序列(5'~3')	酶切位点
S10F	CGA TCT TAT CCA TAA TGG TG	
S10R	GCC ATA GTG TGT CAC GTC TG	
RS10-F	AAGGAAACATTACTTTGAAGCC	
RS10-R	TGGTCAATTCATATTCATCTGG	
S9iF	CGGGGTACCGAACGCAAGAGAATGGCAGACC	<i>Kpn</i> I
S9iR	CGCGGATCCCAATAGAAACCAATAATGACGA	<i>Bam</i> H I

1.2.4 SRBSDV S9 二元抑制载体的构建。将 S9-pGEM 和载体 pDS1301 质粒均使用 *Bam*H I 和 *Kpn* I 双酶切,回收外源片段和酶切后的 pDS1301 载体。然后将它们等摩尔比混合连接,得到的阳性克隆命名为 S9-ds1。再将 S9-pGEM 和 S9-ds1 质粒均用 *Spe* I 和 *Sac* I 双酶切,分别回收外源片段和 S9-ds1 载体,等摩尔比混合连接。获得阳性克隆即 S9 二元抑制载体,命名为 pDS301-S9。双酶切体系为:2 种限制性内切酶 (*Bam*H I 和 *Kpn* I) 各 2 μl,10 × buffer 2.5 μl,质粒为 20 μl,用 ddH₂O 补足至 50 μl,37 °C 酶切 3 h。用 *Spe* I 和 *Sac* I 双酶切时,10 × buffer 5 μl,其余相同。连接体系:利用微量核酸浓度测定仪,测定回收产物的浓度,分别计算载体和外源片段的摩尔数。10 × 连接 buffer 1 μl,连接酶 1 μl,根据计算结果决定外源和载体的体积,其余补足 ddH₂O 至 10 μl。电转 DH10B 感受态后,涂带有卡那霉素抗性的 LB 皿,筛选阳性克隆。

2 结果与分析

2.1 湖北省 SRBSDV 发病植株的鉴定 自从南方各个稻作区暴发 SRBSDV 以来,湖北省作为主要水稻产区也发现有疑似 SRBSDV 的发生,但长期以来认为是另一种病毒病 RBSDV。2010 年在崇阳采集疑似病株进行鉴定(图 1),结果

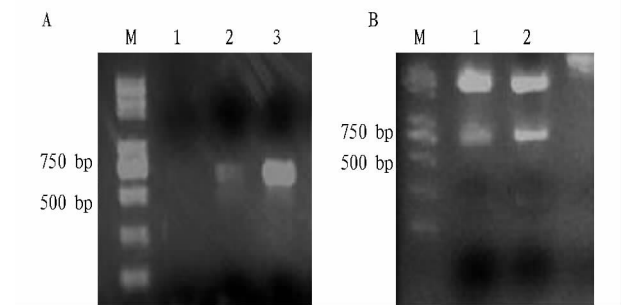
显示湖北省崇阳病毒病疑似植株应是 SRBSDV,不是 RBSDV。应用相同的方法检测鄂州和武汉水稻田疑似病株,结果相同,表明湖北省发生的与 RBSDV 症状高度相似的矮缩病为 SRBSDV。将扩增产物测序结果与 SRBSDV 的 CP 同源性高达 99% (结果未显示)也证实了这一点。



注:1、2、3 为不同的病株,CK1 为阳性对照,CK2 为阴性对照。

图 1 湖北省崇阳水稻矮缩植株 RT-PCR 鉴定

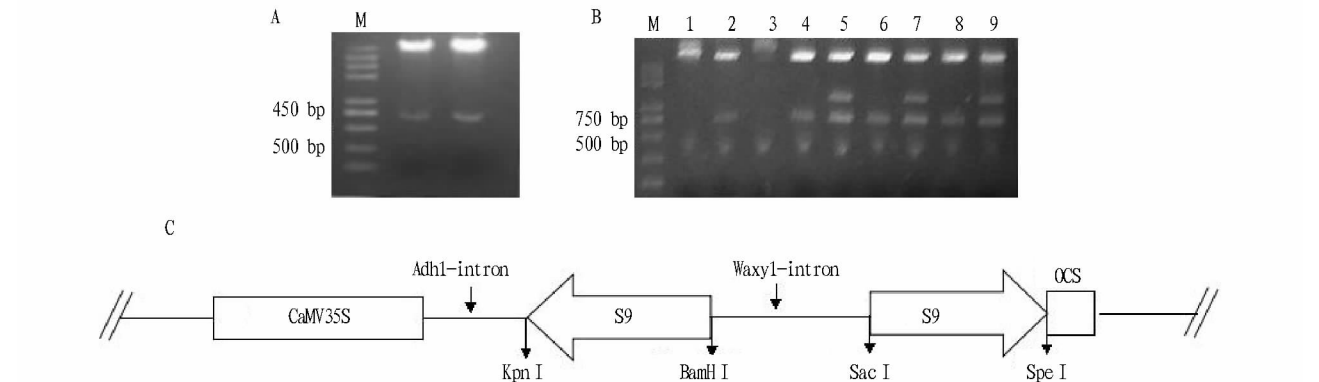
2.2 S9 基因片段的获取 以 SRBSDV 水稻病株 cDNA 作为模板,以 S9iF 和 S9iR 为引物,扩增获取了 703 bp 的基因片段 S9(图 2A)。PCR 扩增获取的片段与预期大小相同。将扩增基因片段连接到 pGEM-GZ 载体上(图 2B),并命名为 S9-pGEM,结果表明,所克隆片段为 SRBSDV S9 基因的部分序列^[10],进一步证实了前面的结果。



注:A. S9iF 和 S9iR PCR 产物;B. S9-pGEM-GZ 克隆 *Bam*H I、*Kpn* I 双酶切鉴定。

图 2 湖北省 SRBSDV 病毒 S9 基因片段的克隆

2.3 RNA 干涉载体 pDS1301-S9 的构建 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Kpn* I 双酶切 S9-pGEM 和 pDS1301 质粒,获取了 S9 基因带有 *Bam*H I 和 *Kpn* I 酶切位点接头的外源片



注:A. S9 第 1 链连接到 pDS1301, *Bam*H I 和 *Kpn* I 双酶切检测;B. S9 第 2 链连接到 pDS1301 上, *Bam*H I 和 *Kpn* I 双酶切检测,5、7、9 是阳性克隆;C. S9 双链抑制载体示意。

图 3 pDS1301-S9 载体构建酶切检测结果

段和载体,回收连接后 S9 基因片段定向插入 pDS1301 载体上,获得阳性克隆,命名为 S9-ds1(图 3A)。此载体上带有 S9 基因的第一链,还需要连接一个反向的第二链。用限制性内切酶 *Spe* I 和 *Sac* I 双酶切 S9-pGEM 和 S9-ds1,回收连接后 S9 基因片段反向插入 S9-ds1 上,即完成了 pDS1301-S9 的构建(图 3B),构建的载体结构见图 3C。

3 讨论

将水稻黄斑驳病毒(Rice yellow mottle virus, RYMV)复制所需酶的基因部分序列构建 RNAi 载体转化水稻,诱发基因沉默,使水稻具有 RYMV 抗性,且抗性能稳定遗传^[11]。利用大麦黄矮病毒(Barley yellow dwarf virus, BYDV)的复制酶基因片断为靶位点构建 RNAi 载体,并将其导入大麦,在 25 个转化系中,有 9 个转化系表现出较强的抗性,且稳定遗传的 2 个株系后代中,用酶联免疫吸附法检测不到接种病毒的存在^[12]。水稻对 SRBSDV 缺乏抗性品种,利用 RNAi 技术创建抗病新种质是一种有效的手段。该研究选择 SRBSDV 的 S9 基因作为靶标创建新种质,这是因为 S9 是 SRBSDV 病毒一个重要的基因,且与 RBSDV 病毒中的 S9 基因具有 76% 以上的同源性。RNA 干涉的机制表明同源基因同源性达到 70% 以上时,双链 RNA 产生的小 RNA 可以干涉同源基因的表达。所以利用 SRBSDV 病毒 S9 基因构建的 RNAi 载体创制的转基因水稻植株可能具备 SRBSDV 和 RBSDV 抗性,为进一步研究用一种病毒的基因序列进行 RNA 干涉从而创制抗 2 种病毒的水稻新种质提供研究基础。

参考文献

[1] 周国辉,温锦君,蔡德江,等. 呼肠孤病毒科斐济病毒属一新种:南方水

稻黑条矮缩病毒[J]. 科学通报,2008,53(20):2500-2508.

- [2] POWELL A P, NELSON R S, DE B, et al. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene[J]. Science, 1986, 2: 738-743.
- [3] GOLEMBOSKI D B, LOMONOSOFF G P, ZAITLIN M. Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 6311-6315.
- [4] TENLLADO F, GARCÍA-LUQUE I, SERRA M T, et al. Rapid detection and differentiation of tobamoviruses infecting Lresistant genotypes of pepper by RT-PCR and restriction analysis[J]. J Virol Methods, 1994, 47: 165-174.
- [5] SEPPÄNEN P, PUSKA R, HONKANEN J, et al. Movement protein-derived resistance to triple gene block-containing plant viruses[J]. J Gen Virol, 1997, 78: 1241-1246.
- [6] COOPER B, LAPIDOT M, HEICK J A, et al. A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility[J]. Virology, 1995, 206: 307-313.
- [7] YUAN B, SHEN X, LI X, et al. Mitogen-activated protein Kinase OsMPK6 negatively regulates rice disease resistance to bacterial pathogens[J]. Planta, 2007, 226: 953-960.
- [8] 刘红艳, 潘凤英, 李建勇, 等. 广西南方水稻黑条矮缩病毒的 RT-PCR 检测[C]//彭友良, 王宗华. 中国植物病理学会-2010 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2010: 369.
- [9] 王朝辉, 周益军, 范永坚, 等. 应用 RT-PCR、斑点杂交和 SDS-PAGE 检测水稻黑条矮缩病毒[J]. 南京农业大学学报, 2001, 24(4): 24-28.
- [10] ZHANG H M, YANG J, CHEN J P, et al. A black-streaked dwarf disease on rice in China is caused by a novel fivirus[J]. Arch Virol, 2008, 153: 1893-1898.
- [11] PINTO Y M, KOK RA, BAULCOMBE D C. Resistance to rice yellow mottle virus (RYMV) in cultivated African rice varieties containing RYMV transgenes[J]. Nature Bio, 1999, 17: 702-707.
- [12] WANG M B, ABBOTT D C, WATERHOUSE P M. A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus[J]. Mol Plant Path, 2000, 1: 347-356.

(上接第 12047 页)

3 讨论

分子生物学的发展使得种质资源之间的遗传性以及亲缘关系得到了明确。特别是 ISSR 标记技术, 凭借其较好的稳定性、试验的可重复性以及操作简单、快速、高效等优点^[2-4], 广泛应用于基因定位、品种鉴定、遗传作图、系统发育^[5]、进化及分子生态学等研究中, 特别是应用于遗传多样性和亲缘关系研究中^[6-7]。

从该试验看, ISSR 分子标记是一种较为理想的标记方法, 在一定程度上可以确定各个种质材料之间的遗传关系。但由于目前的种质材料繁多, 特别是经过多年的种植和应用, 难免会有基因漂移、突变等因素, 所以笔者只能确定该试验材料之间的亲缘关系。该试验却与公认的分类有出入。如郑 58 属于瑞种质, Mo17 属于兰卡斯特种质, 却被分在了同一个类群。这也与王寒玉等得出的试验结论相同^[8-9]。另外, 读取条带时为人工读带, 可能会存在不同的人读取的条带会有所差异, 以及聚类分析软件的不相同, 这也是试验结果可能不一致的原因。所以划分的种群是相对的。

4 结论

该研究表明, 利用 ISSR 分子标记技术对玉米进行遗传

多样性分析是可行的。但此方面研究还应与实际育种工作相结合, 使得育种工作者可以充分了解材料的育种变异信息, 有针对性地选择亲本, 有效提高育种效率^[10], 培育优质的新品种, 才能更好地为育种工作提供理论依据。

参考文献

- [1] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20(2): 176-183.
- [2] 方宣均, 吴为人, 唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [3] 李洪伟, 沙伟. ISSR 技术及其在玉米研究中的应用[J]. 齐齐哈尔大学学报, 2007, 7(4): 88-90.
- [4] 罗海燕, 陈业渊. ISSR 分子标记及其应用[J]. 安徽农学通报, 2008, 14(19): 45-46.
- [5] 陈龙, 王家良, 杨贤松. ISSR 分子标记及其在植物分子生物学中的应用[J]. 种子, 2007, 10(26): 49-52.
- [6] 钱伟, 葛洪, 洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性[J]. 植物学报, 2000, 42(7): 741-750.
- [7] 马朝芝, 傅廷栋, STINE TUEVESSON, 等. 用 ISSR 标记技术分析中国和瑞典甘蓝型油菜的遗传多样性[J]. 中国农业科学, 2003, 36(11): 1403-1408.
- [8] 王寒玉, 杜艳伟, 李萍, 等. 40 份玉米自交系的 ISSR 遗传多样性分析[J]. 山西农业科学, 2010, 38(7): 11-15.
- [9] 程春明, 石云素, 宋燕春, 等. ISSR 分子标记技术在分析玉米自交系遗传关系研究中的适用性[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(2): 172-177.
- [10] 赵欣欣, 崔克艳, 刘光涛, 等. 玉米自交系的 ISSR 聚类分析[J]. 吉林农业大学学报, 2009, 31(2): 131-134.