

# 小麦防御素基因 *TaPDF35* 的克隆与功能分析

王敏霞, 祝秀亮, 罗美英, 张增艳

(中国农业科学院作物科学研究所/农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程/  
农业部麦类生物学与遗传育种重点实验室, 北京 100081)

**摘要:**从抗纹枯病小麦品种 CI12633 中克隆出一个小麦防御素基因 *TaPDF35*, 并对其表达特性及功能进行了分析。*TaPDF35* 基因包含一个长为 249 bp 的开放阅读框(ORF, open reading frame), 编码 82 个氨基酸组成的多肽 TaPDF35。预测分析表明, TaPDF35 能形成由 1 个  $\alpha$  螺旋和 3 股反向平行的  $\beta$ -折叠片组成的  $\alpha\beta$ (CS $\alpha\beta$ ) 基序,  $\alpha\beta$ (CS $\alpha\beta$ ) 基序由 8 个半胱氨酸形成的 4 个二硫键固定。TaPDF35 的 N 端有一段 27 个氨基酸的信号肽。表达分析结果表明, *TaPDF35* 基因在抗纹枯病小麦品种 CI12633 和山红麦中的表达量显著高于在感纹枯病小麦品种扬麦 158 和温麦 6 号中的表达量; 该基因在小麦的叶鞘和茎中均有表达, 且受纹枯病原菌诱导而上调表达。利用大麦条形花叶病毒(BSMV, barley stripe mosaic virus)诱导的基因沉默技术(VIGS, virus-induced gene silencing)降低抗纹枯病小麦品种 CI12633 中 *TaPDF35* 基因的转录水平, 再接种纹枯病原菌进行纹枯病抗性鉴定。结果显示, 与接种 BSMV:GFP 的 CI12633 对照植株相比, *TaPDF35* 表达水平降低的 CI12633 植株对纹枯病的抗性显著降低, 表明 *TaPDF35* 表达是小麦防御纹枯病反应所需的。

**关键词:**小麦防御素 *TaPDF35*; 小麦纹枯病; 抗病反应; 病毒诱导的基因沉默

## Cloning and Defensive Functional Analysis of a Wheat Defensin Gene *TaPDF35*

WANG Min-xia, ZHU Xiu-liang, LUO Mei-ying, ZHANG Zeng-yan

(Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/The National Key Facility for Crop Gene  
Resources and Genetic Improvement/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Triticeae  
Crops, Ministry of Agriculture, Beijing 100081)

**Abstract:** In this study, a wheat defensin gene *TaPDF35* was cloned from sharp eyespot-resistant wheat cultivar CI12633, and its expression and function were analyzed. *TaPDF35* contained an open reading frame(ORF) with 249 bp length, and encoded a peptide TaPDF35 consisting of 82 amino acid. The peptide TaPDF35 included a signal peptide with 27 amino acid length at its N-terminus. The mature protein forms a typical  $\alpha\beta$ (CS $\alpha\beta$ ) motif, which contained an  $\alpha$  helix and a triple-stranded anti-parallel  $\beta$ -sheet and was stabilized through four disulfide bridges formed by eight cysteines. Real-time RT-PCR analysis showed that the expression levels of *TaPDF35* gene in sharp eyespot-resistant wheat cultivars CI12633 and Shanhongmai were significantly higher than those in sharp eyespot-susceptible wheat cultivars Yangmai158 and Wenmai 6. *TaPDF35* was expressed in both leaf sheath and stem, and the expression was up-regulated after infection of *Rhizoctonia cerealis* van der Hoeven(the pathogen of sharp eyespot). Through barley stripe mosaic virus(BSMV) based virus-induced gene-silencing(VIGS) method, the expression of *TaPDF35* was silenced in CI12633 plants induced by BSMV; TaPDF35 compared with control plants induced by BSMV:GFP. Both *TaPDF35*-silencing and control CI12633 plants were then inoculated with *Rhizoctonia cerealis* van der Hoeven, and the results showed that *TaPDF35*-silencing CI12633 plants showed more susceptible to *Rhi*-

收稿日期:2017-03-02 修回日期:2017-03-23 网络出版日期:2017-08-11

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170811.1526.004.html>

基金项目:国家转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08002-001-004)

第一作者研究方向为分子育种。E-mail:1343478468@qq.com

通信作者:张增艳,研究方向为小麦抗病分子生物学。E-mail:zhangzengyan@caas.cn

*zoctonia cerealis* van der Hoeven infection compared with CI12633 control plants. The results suggest that the expression of *TaPDF35* is required for wheat defense response to *Rhizoctonia cerealis* van der Hoeven infection.

**Key words:** wheat defensin *TaPDF35*; wheat sharp eyespot; resistance response; virus-induced gene silencing

小麦纹枯病又称小麦尖眼点病(wheat sharp eyespot),是由禾谷丝核菌(*Rhizoctonia cerealis* van der Hoeven)或立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kühn)侵染引起的小麦土传真菌病害,在世界范围内皆有发生。在我国,小麦纹枯病主要是由禾谷丝核菌侵染引起的<sup>[1]</sup>,通过侵染小麦(*Triticum aestivum* L.)的叶鞘和茎部,引起小麦组织坏死,形成褐色云纹花秆状病斑,严重情况下病株形成枯白穗<sup>[1-5]</sup>,严重影响了小麦的产量。据2012-2016年间病虫害测报处(中国农业信息网, <http://www.agri.cn/>)的数据分析显示,小麦纹枯病发病面积为总病害发病面积的23%~32.5%,一般可造成减产10%左右,严重达40%以上。目前,在小麦纹枯病发生区域对纹枯病的防治以化学防治为主,对环境有污染且效果不佳。因此,迫切需要挖掘并克隆抗小麦纹枯病重要基因,加强对其功能与实用价值的研究。

植物防御素(也称为抗菌肽),是一类分子量小、呈碱性、富含半胱氨酸且具有抑菌活性的多肽,在植物界普遍存在,参与植物对病原菌的防御反应,是抵制病原菌侵染的重要卫士<sup>[6-7]</sup>。植物防御素一般由45~50个氨基酸残基组成<sup>[8]</sup>。不同的防御素氨基酸序列相似度较低,但具有相同的三级结构:1个 $\alpha$ 螺旋和3股反向平行的 $\beta$ -折叠片组成的典型的 $\alpha\beta$ (CS $\alpha\beta$ )基序,由8个半胱氨酸形成的4个二硫键固定<sup>[9-11]</sup>。植物防御素有不同的表达模式,主要呈组织特异性表达和病原菌诱导性表达<sup>[12]</sup>。如拟南芥*PDF1.2*是茉莉酸途径中的防卫标识基因,受病原体侵染而上调表达<sup>[13]</sup>。拟南芥防御素*PDF1.1*、*PDF2.1*、*PDF2.2*基因具有组织特异性表达的特性<sup>[14-15]</sup>。体外抑菌实验与转基因植物功能证明,一些植物防御素具有显著的抗菌效果。例如,马铃薯抗菌肽SN1是从马铃薯块茎中分离的一种富含半胱氨酸的防御素,能显著抑制番茄溃疡病菌(*Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis)、立枯镰刀菌(*Fusarium solani* (Mark.) Sacc)、玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis* (Nisik) Shomaker)、黄瓜炭疽病(*Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ell. and Halst.)、灰霉病菌(*Botrytis cinerea* Pers. Ex. Fr.)的生长<sup>[16]</sup>。转抗菌肽SN1基因马铃薯对立枯丝核菌、软腐菌的抗性显著提高<sup>[17]</sup>。本实验室进行的体外抑菌试验

结果表明,SN1显著抑制禾谷丝核菌和平脐蠕孢菌(*Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker)菌丝的生长<sup>[18]</sup>,转SN1基因的小麦株系提高了对纹枯病、根腐病<sup>[19]</sup>和全蚀病<sup>[20]</sup>的抗性。萝卜(*Raphanus sativus* L.)种子抗菌肽Rs-AFP2在体外能抑制禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum* Schw.)、粉色面包霉菌(*Neurospora crassa* Shear and B. O. Dodge.)、麦类德氏霉菌(*Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs.)、稻瘟菌(*Magnaporthe oryzae* (Hebert) Barr.)<sup>[21-23]</sup>、禾谷丝核菌<sup>[24]</sup>的菌丝生长。高水平表达的转Rs-AFP2基因烟草植株对赤星病菌(*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.)抗性显著增强<sup>[22]</sup>。转基因水稻(*Oryza sativa* L.)中Rs-AFP2的表达,能抑制77%的稻瘟病菌和45%的立枯丝核菌的生长,显著增强了转基因水稻对稻瘟病菌和纹枯病菌的抗性,从转Rs-AFP2基因水稻的叶片提取的蛋白质对稻瘟病菌的体外生长有抑制活性<sup>[25]</sup>。转RsAFP2基因小麦可以提高对禾谷镰刀菌和禾谷丝核菌的抗性<sup>[26]</sup>。然而,关于小麦内源防御素基因功能研究报道尚少。

VIGS是快速研究植物基因功能的有效方法。大麦条纹花叶病毒(BSMV, barley stripe mosaic virus)介导的基因沉默是快速分析麦类作物基因功能的方法,目前已广泛应用到大麦和小麦的基因功能研究中<sup>[27-28]</sup>。BSMV由3条单链 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ RNA组成<sup>[29]</sup>,将要沉默的植株基因的特异性片段反向插入 $\gamma$ 链的DNA载体上,再转录成RNA,与 $\alpha$ 、 $\beta$ 链组成重组BSMV病毒。如BSMV-VIGS结合抗病鉴定试验结果表明,小麦*TaADF7*基因表达量的降低增加了小麦对条锈菌(*Puccinia striiformis* West.)的敏感性<sup>[30]</sup>。利用BSMV-VIGS技术获得*TaPIE1*基因表达降低的小麦植株接种抗病鉴定结果表明小麦转录因子*TaPIE1*、*TaRIM1*基因正向调控寄主对禾谷丝核菌的抗性反应<sup>[28,31]</sup>。

本研究利用小麦基因芯片中筛选出的一个防御素基因*TaPDF35*(探针号:Ta.20930.1.S1\_at)探针序列为起点,从抗纹枯病小麦品种CI12633中克隆了该防御素基因,对*TaPDF35*的表达特性进行了分析,构建了*TaPDF35*基因的大麦条纹花叶病毒(BSMV)诱导的基因沉默(VIGS)载体,分析了*TaP-*

*DF35* 对小麦纹枯病的防御功能, 以期小麦抗纹枯病分子育种提供候选基因。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料与病原菌

抗纹枯病小麦品种 CII2633 和山红麦分别由江苏省农业科学院蔡士宾研究员、本所贾继增研究员馈赠, 中抗纹枯病小麦品种山农 0431 由山东农业大学李斯深教授馈赠, 感纹枯病小麦品种温麦 6 号由本所贾继增研究员馈赠, 中感纹枯病小麦品种扬麦 158 受赠于江苏里下河地区农科所程顺和院士; 山东地区强致病力纹枯菌 (*R. cerealis*) 生理小种 WK207 由山东农业大学于金凤教授馈赠。

### 1.2 RNA 的提取以及第 1 链 cDNA 的合成

使用 Trizol 试剂盒提取小麦总 RNA, 经 RNase-free 的 DNase I 纯化, 用快速反转录试剂盒 (Fast Quant Kit) 进行第 1 链 cDNA 合成。

### 1.3 *TaPDF35* 基因的克隆及序列分析

根据 *TaPDF35* 基因的 EST 序列 CA630387 在 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行 Blast 比对, 得到与之相似度为 99% 的序列 (登录号为 BT009100)。根据 BT009100 的核苷酸序列设计引物, BT0091-23U1: 5'-GCTAACACAGTCCCCCGT-3', BT0091-479L1-2: 5'-CAGAGTCAACTCACGAACAA-3' 和 BT0091-31U 2: 5'-AGTCCCCGTATGTAGCA-3', 采用巢式 PCR 扩增该基因。巢式 PCR 扩增第 1 轮程序为: 98 °C 1 min; (98 °C 10 s, 56 °C 5 s, 72 °C 40 s) × 30; 72 °C 10 min; 16 °C 保存, 将第 1 轮 PCR 扩增产物稀释 100 倍, 作为第 2 轮扩增的模板。第 2 轮扩增程序为: 98 °C 1 min; (98 °C 10 s, 57 °C 5 s, 72 °C 40 s) × 35; 72 °C 10 min; 16 °C 保存。产物经过 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收, 并连接到 pUC-T 载体进行测序。用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>) 分析 *TaPDF35* 基因编码氨基酸的理化性质, 用 SignalP 4.1 在线工具分析其氨基酸序列中的信号肽信息, 用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测基因的三级结构, 在 NCBI 中搜索 *TaPDF35* 编码蛋白的同源性序列, 并用 Clustal X 进行比对分析。

### 1.4 *TaPDF35* 基因的表达分析

**1.4.1 *TaPDF35* 在抗、感纹枯病小麦中的表达分析** 播种抗纹枯病小麦品种 CII2633、山红麦, 中抗纹枯病小麦品种山农 0431 以及感纹枯病小麦品种

扬麦 158、温麦 6 号, 生长至拔节期, 用牙签法接种小麦纹枯菌 WK207。在接种后 21 d, 取接种部位样品, 提取样品的总 RNA。反转录合成第 1 链 cDNA, 用实时荧光定量 RT-PCR 分析 *TaPDF35* 在小麦抗纹枯病材料和感纹枯病材料中的表达情况。用软件 Primer Premier 5.0 设计 *TaPDF35* 基因特异性引物, TaPDF35-Q-244F: 5'-CACCGAGAAGTCCCGA-3' 和 TaPDF35-Q-495R: 5'-AACCAAACCTACCGAGTCCC-3', 以 *TaActin* 基因为内参, TaActin-F: 5'-CACTGGAATGGTCAAGGCTG-3'; TaActin-R: 5'-CTCCATGTCATCCCAGTTG-3'。用 ABI PRISM 7500 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI, 美国) 进行实时荧光定量 RT-PCR 试验, 参照 TIANGEN 公司 SuperReal premix plus (SYBR green) 试剂盒说明书设计反应体系为: 2 × SuperReal PreMix Plus 12.5 μL、上游引物 (10 μmol/L) 0.75 μL、下游引物 (10 μmol/L) 0.75 μL、cDNA 模板 8.0 μL、50 × ROX Reference Dye 0.50 μL, 补 RNase-free ddH<sub>2</sub>O 至 25 μL; 扩增程序: 95 °C 预变性 15 min; 95 °C 变性 10 s, 57 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 32 s, 40 个循环。对每个样品进行 3 次独立的重复实验, 以感纹枯病小麦温麦 6 号为对照, 用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 方法<sup>[32]</sup> 计算不同抗性小麦中 *TaPDF35* 基因的相对表达量。用 Microsoft Excel 软件进行 *t*-检验 (两尾检验), 将 *P* < 0.05 视为具有显著性差异, *P* < 0.01 视为具有极显著差异。

**1.4.2 *TaPDF35* 基因的组织表达和受纹枯菌诱导表达分析** 抗纹枯病小麦 CII2633 生长到抽穗期, 采用牙签法接种小麦纹枯菌 WK207, 放置在 25 °C/14 h 光照、-12 °C/10 h 黑暗条件下生长。分别在接种纹枯菌前 0 h、接种后 36 h 以及接种后 72 h, 3 个时间点取茎和叶鞘部位的样品。提取样品 RNA, 经反转录成第 1 链 cDNA 后, 用实时荧光定量 PCR 分析 *TaPDF35* 在小麦抗纹枯病 CII2633 的茎和叶鞘中的表达, 以及受小麦纹枯菌诱导的表达。所用引物、试剂、仪器及其数据分析方法同上。

### 1.5 BSMV-VIGS 试验分析 *TaPDF35* 基因的抗纹枯病功能

根据 *TaPDF35* 基因的 EST 序列 CA630387, 用软件 Primer Premier 5.0 设计一对引物 CA630387-VIGS-92F: 5'-TACGCTAGCGATGTCCTGCTTTT-GCT-3' 和 CA630387-VIGS-290R: 5'-GACGCTAGCACGTCCTCCATGCTGAAAT-3', 引入 *Nhe* I 酶切位点 (下划线部分), 用保真性较好的 PremeSTAR HS

DNA Polymerase (TAKARA) 从抗纹枯病小麦品种 CI12633 中扩增出 *TaPDF35* 基因 3' 端长度为 199 bp 的片段, 用 *Nhe* I 限制性内切酶酶切扩增片段和  $\gamma$ -GFP 载体质粒, 回收后过夜连接, 用  $\gamma$ -GFP 载体上的通用引物  $\gamma$ -p: 5'-CAACTGCCAATCGTGAG-TAGG-3' 作上游引物; CA630387-VIGS-92F: 5'-TACGCTAGCGATGTCCGTGCCTTTTGCT-3' 作下游引物, 经 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳鉴定出目的片段反向插入的阳性克隆并进行测序, 将测序结果正确的克隆命名为  $\gamma$ -*TaPDF35*。  $\alpha$ 、 $\gamma$ -GFP、 $\gamma$ -*TaPDF35* 载体质粒用 *Q. Cut Mlu* I 进行酶切,  $\beta$  质粒用 *Q. Cut Spe* I 进行酶切, 将环状质粒线性化, 以线性化的质粒为模板, 参照文献 [33-34] 的试验方法, 进行体外转录反应。  $\gamma$ -GFP、 $\gamma$ -*TaPDF35* 转录产物分别与等体积的  $\alpha$  和  $\beta$  转录产物混合 (每组混合后 30  $\mu$ L), 加 2 倍体积的 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O (60  $\mu$ L), 总体积变为 90  $\mu$ L, 再加 1 倍体积的 2  $\times$  GKP Buffer (50 mmol/L Glycine; 30 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 9.2; 1% Bentonite; 1% Celite), 最终得到总体积为 180  $\mu$ L 的病毒接种混合液。

待小麦幼苗长至 2 叶 1 心, 摩擦接种重组 BSMV 病毒混合液 ( $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$ -*TaPDF35* 的转录混合液), 同时接种  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$ -GFP 的重组 BSMV 病毒作为对照。 每个叶片接种 10  $\mu$ L。 完成后, 向小麦幼苗呈雾状喷施 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O, 22 ~ 23  $^{\circ}$ C 条件下保湿 48 h, 然后移到正常生长环境中。 待小麦新生叶片表现出条纹状后, 取样提 RNA, 反转录成第 1 链 cDNA, 用 BSMV-CP-F/BSMV-CP-R 检测 BSMV 的外壳蛋白 CP 基因的转录表达。 *TaPDF35* 基因特异引物 *TaPDF35*-Q-244F 和 *TaPDF35*-Q-495R 作为检测引物, 实时荧光定量 RT-PCR 分析 *TaPDF35* 基因表达量, 确定成功接种 BSMV 重组病毒的 CI12633 植株中 *TaPDF35* 基因沉默水平。

### 1.6 小麦纹枯病的接种与鉴定

采用牙签接种法接种小麦纹枯菌: 用牙签培养纹枯菌, 待菌丝长满牙签的表面时使用。 在小麦生长至拔节期, 将长满菌丝的牙签嵌入到基部茎秆与叶鞘之间, 每个茎秆接种一根长满菌丝的牙签, 接种完成后, 用润湿过的脱脂棉包裹接种部位, 将小麦植株移到 25  $^{\circ}$ C/14 h 光照、-12  $^{\circ}$ C/10 h 黑暗环境中生长, 每天喷水 2 次, 保持接种部位湿润, 持续 1 周, 25 d 后统计发病情况。

鉴定时, 按 5 级标准<sup>[35]</sup> 划分小麦纹枯病的病级

(IT, infection type)。 其中, 0 级为全株无病; 1 级为叶鞘有少量病斑, 但还没有侵染茎; 2 级为病菌侵入茎秆, 茎秆病斑面积小于 1/4; 3 级为茎秆病斑面积介于 1/4 ~ 1/2 之间; 4 级为茎秆病斑面积介于 1/2 ~ 3/4 之间; 5 级为茎秆病斑面积大于 3/4, 且植株出现枯白穗。

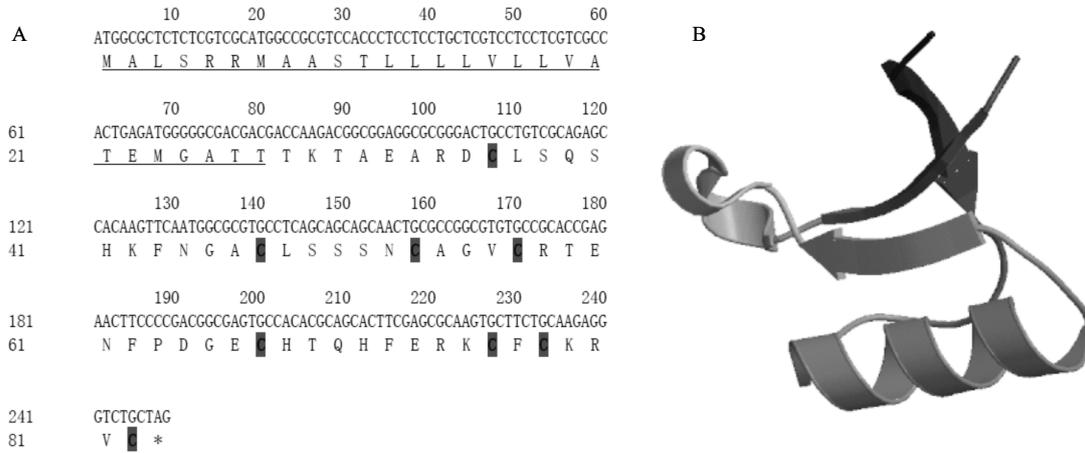
## 2 结果与分析

### 2.1 *TaPDF35* 基因的克隆与序列分析

通过序列比对, 克隆得到的 *TaPDF35* 基因序列与登录号为 BT009100 的序列具有 99% 的相似性。 序列分析显示, *TaPDF35* 基因有一个长度为 249 bp 的开放阅读框, 编码 82 个氨基酸组成的多肽 *TaPDF35*。 *TaPDF35* 的预测分子量为 8.96 kD, 等电点是 8.50。 *TaPDF35* 的 N 端具有一段长为 27 个氨基酸的信号肽, 并且具有 8 个半胱氨酸残基 (图 1A), 其三级结构由 3 股反向平行的  $\beta$ -折叠片和一个  $\alpha$ -螺旋组成 (图 1B)。 将 *TaPDF35* 多肽序列用 NCBI 的 Blast 工具 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行比对, 发现 *TaPDF35* 与 NCBI 数据库中的乌拉尔图小麦 (EMS64594.1)、粗山羊草 (XP\_020198481.1)、二穗短柄草 (XP\_003575412.1)、甘蔗 (ACB20518.1)、玉米 (CEJ09690.1)、大麦 (BAJ89304.1)、谷子 (XP\_004953175.1)、花烟草 (AOD75394.1)、辣椒 (AAL35366.1)、野生大豆 (KHN06998.1)、拟南芥 (NP\_178319.1) 和蒺藜苜蓿 (XP\_003629332.1) 同源, 相似性分别为 65.43%、82.72%、79.75%、74.68%、72.15%、72.15%、65.00%、70.00%、59.74%、46.84%、43.42% 和 41.25%。 对这些基因的 C 端序列进行比对分析发现, C 端的保守性比较高, 且均具有 8 个半胱氨酸的保守结构 (图 2)。

### 2.2 *TaPDF35* 基因的表达特性分析

用实时荧光定量 RT-PCR 方法分析 *TaPDF35* 基因在接种纹枯菌 21 d 的抗、感纹枯病小麦中的表达情况。 结果表明, *TaPDF35* 基因在抗纹枯病材料小麦 CI12633 和山红麦中的表达量显著高于在感纹枯病材料扬麦 158 和温麦 6 号中的表达量 (图 3)。 *TaPDF35* 基因在抗纹枯病小麦 CI12633 不同部位以及受纹枯菌诱导表达结果显示: 未接种纹枯菌的情况下, 叶鞘中的表达量显著高于在茎中的表达量; 在接种纹枯菌后 36 h 和 72 h, *TaPDF35* 基因在叶鞘、茎中的表达量均显著升高 (图 4)。



横线部分表示信号肽;阴影表示 8 个半胱氨酸

The sequence underlined indicates signal peptide, eight cysteine residues marked in shade

图 1 小麦 *TaPDF35* 基因的核苷酸、氨基酸序列 (A) 以及三级结构模型 (B)

Fig. 1 Nucleotide, deduced amino acid sequences (A) and structure model (B) of *TaPDF35* gene

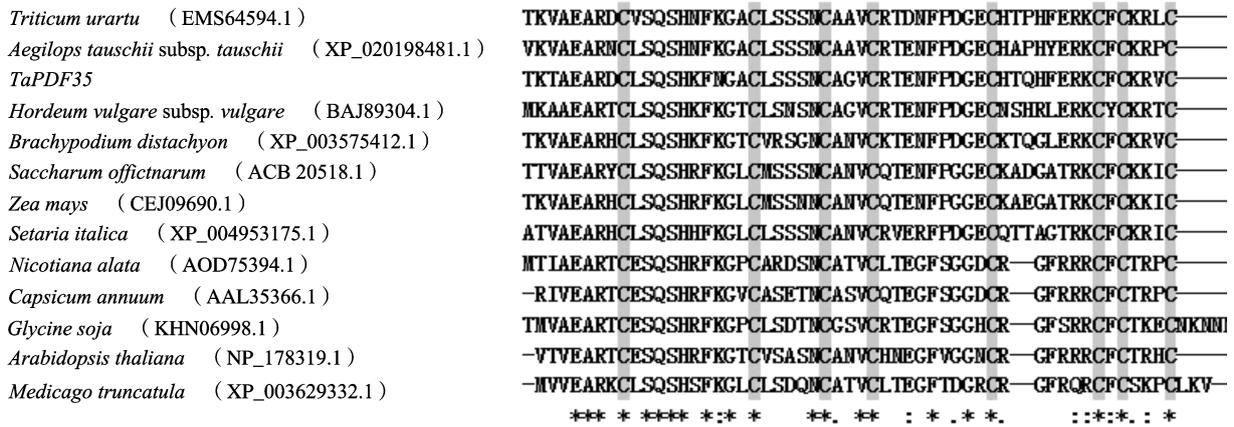


图 2 小麦基因 *TaPDF35* 氨基酸序列与其他物种同源氨基酸序列多重比对结果  
Fig. 2 Alignment of the wheat *TaPDF35* amino acid sequence and its homologous amino acid sequences from other species

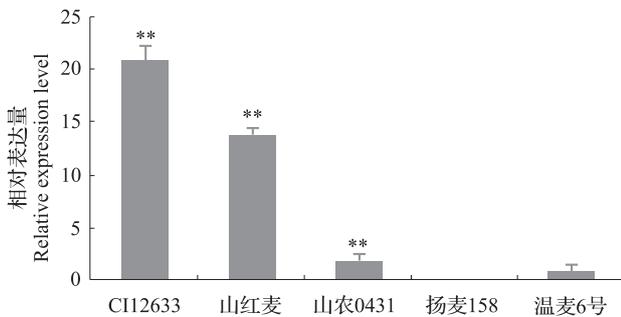


图 3 *TaPDF35* 基因在抗纹枯病和感纹枯病小麦品种中的表达分析

Fig. 3 Expression analysis of *TaPDF35* in sharp eyespot-resistant and sharp eyespot-susceptible wheat cultivars

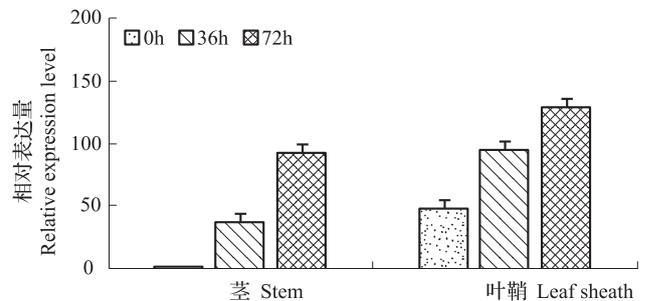


图 4 小麦叶鞘和茎中 *TaPDF35* 基因受纹枯菌的诱导表达分析

Fig. 4 Expression analysis of *TaPDF35* induced by *R. cerealis* van der Hoeven in the leaf sheath and stems of wheat

### 2.3 BSMV-VIGS 分析 *TaPDF35* 基因在小麦抗纹枯病反应中的功能

将 *TaPDF35* 基因 3' 端一段长度为 199 bp 的特异序列反向插入 BSMV 病毒的  $\gamma$  链中, 构成 BSMV 重组载体  $\gamma$ -*TaPDF35* (图 5)。经线性化、转录, 摩擦接种小麦品种 CI12633, 接种病毒后第 6 天在新生叶片开始观察到病毒斑, 接种病毒后第 10 天, 即可观察到明显的病毒斑 (图 6)。取第 10 天的叶片, 提取总 RNA, 经反转录得到第 1 链 cDNA, BSMV 外壳蛋白编码基因 *CP* 的检测结果显示植株中 *CP* 基因皆转录表达 (图 6)。这说明 BSMV 病毒成功转染到小麦中, 并进行了大量增殖, 即 BSMV 病毒接种成功。

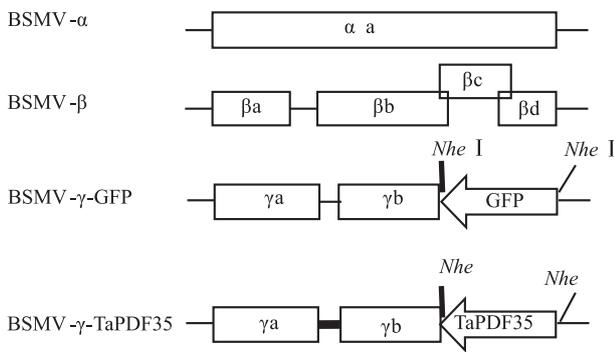


图 5 BSMV: *TaPDF35* 重组载体图

Fig. 5 Map of BSMV: *TaPDF35* recombination vector

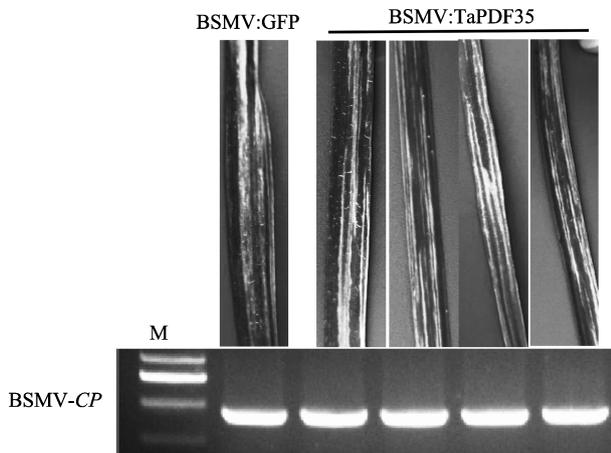


图 6 接种 BSMV 病毒后小麦花叶表型及 BSMV 外壳蛋白编码基因的 RT-PCR 检测

Fig. 6 Chlorotic mosaic symptoms and RT-PCR analysis of the *CP* gene of BSMV infected wheat cv CI12633

为了检测 *TaPDF35* 基因表达的沉默情况, 提取具有条纹病斑叶片的总 RNA, 反转录合成 cDNA, 以接种 BSMV:GFP ( $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$ -GFP 转录混合物) 植株为对照, 实时荧光定量 RT-PCR 分析接种 BSMV: *TaPDF35* ( $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$ -*TaPDF35* 的转录混合物) 病毒

的 CI12633 植株中 *TaPDF35* 基因的表达量。结果所示, 接种 BSMV: *TaPDF35* 病毒的 CI12633 植株中 *TaPDF35* 基因的表达量显著降低 (图 7)。

接种 BSMV 重组病毒后, 在小麦 CI12633 植株拔节期, 采用牙签法接种纹枯病菌 WK207, 分析 *TaPDF35* 基因表达沉默对小麦抗纹枯病抗性的影响。接种纹枯菌 30 d, 所有 CI12633 植株都有典型纹枯病症状。与接种 BSMV:GFP 植株相比, 接种 BSMV: *TaPDF35* 植株的纹枯病病斑更加明显。病级统计显示: 接种 BSMV:GFP 植株病级为 2~3 级, 接种 BSMV: *TaPDF35* 植株平均病级为 3.4 (*t*-检验,  $P=0.03$ ), 说明 *TaPDF35* 基因的沉默表达减弱了小麦品种 CI12633 对纹枯病的抗性 (图 7)。

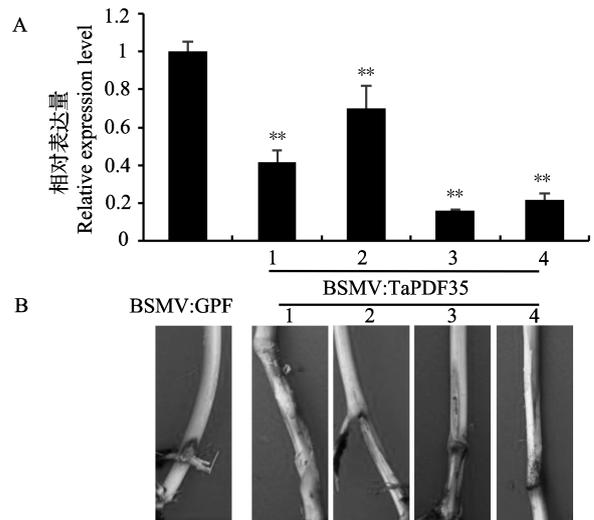


图 7 接种纹枯菌小麦中 *TaPDF35* 基因的表达分析 (A) 和纹枯病表型 (B)

Fig. 7 Expression analysis of *TaPDF35* in wheat inoculated with *R. cerealis* van der Hoeven (A) and sharp eyespot phenotype (B)

### 3 讨论

防御素在植物界中广泛存在。1990 年, 第一个植物的防御素基因从大麦<sup>[36]</sup>和小麦<sup>[37]</sup>中分离出来, 目前, 在小麦中已经发现 40 多个防御素基因, 但关于小麦防御素在寄主防御反应中作用的研究报道尚少。仅有报道从冬小麦品种 Chihoku 中克隆出 *Tad1* 基因<sup>[38]</sup>, 并对 *Tad1* 基因在小麦对雪霉 (Snow mold) 和禾谷镰刀菌防御反应中的作用进行了分析<sup>[39]</sup>。

本研究从小麦基因芯片中筛选出一个防御素基因 *TaPDF35*。对 *TaPDF35* 进行生物信息学分析显示, 该基因有一个 249 bp 的开放阅读框 (ORF), 编

码 82 个氨基酸组成的多肽 TaPDF35; TaPDF35 N 端具有一段长为 27 个氨基酸的信号肽, 并且具有 8 个半胱氨酸残基(图 1A), 其三级结构由 3 股反平行的  $\beta$ -折叠片和一个  $\alpha$ -螺旋组成(图 1B)。TaPDF35 具有防御素的典型结构, 由 8 个半胱氨酸构成的 4 个二硫键固定。

植物防御素参与植物的防御反应, 并且它们在植物体内的分布与其防御作用是相对应的。在叶、块茎、花、荚和种子中被鉴定的防御素, 在保护发芽种子和发育幼苗中起重要作用<sup>[36]</sup>。此外, 植物防御素也在木质部、气孔和气孔细胞、薄壁组织细胞和其他外周区域中表达<sup>[40]</sup>, 这些位点是植物体与病原体首次接触的位置。小麦茎基部的茎秆和叶鞘是小麦纹枯病的主要发病部位。本研究中 *TaPDF35* 基因在抗纹枯病小麦品种 CI12633 的叶鞘和茎中均有表达, 这与其对小麦纹枯病的防御作用也是一致的。另外, 防御素基因的表达受胁迫的诱导。接种纹枯病菌 WK207 后, *TaPDF35* 基因在茎基部的茎秆和叶鞘部位的表达量皆有显著增加, 也暗示 *TaPDF35* 与小麦对纹枯病的防御相关。本研究用 BSMV-VIGS 技术降低 *TaPDF35* 基因在抗性小麦 CI12633 植株中的表达水平, 并接种纹枯病菌于 *TaPDF35* 沉默植株的茎基部, 对其纹枯病发病情况进行统计分析。接种 BSMV:GFP 植株的病级为 2~3 级, *TaPDF35* 沉默植株的平均病级为 3~4 级, 说明 *TaPDF35* 基因的沉默表达减弱了小麦品种 CI12633 对纹枯病的抗性, 即本研究从反向证明了 *TaPDF35* 参与了小麦对纹枯病菌的防御反应。

#### 参考文献

- [1] 陈延熙, 唐文华, 张敦华, 等. 我国小麦纹枯病病原学的初步研究[J]. 植物保护学报, 1986, 13(1): 39-44
- [2] 洪彦涛, 张增艳. 利用荧光定量 PCR 检测禾谷丝核菌的相对生物量[J]. 植物保护, 2015, 41(1): 116-121
- [3] 孟祥启. 小麦纹枯病产量损失和防治指标的研究[J]. 北京农业大学学报, 1990(S1): 41-50
- [4] 石明旺, 茹振刚, 牛立元, 等. 不同小麦品种对小麦纹枯病抗性及其产量损失测定的研究[J]. 河南职业技术学院学报, 2000, 28(1): 15-18
- [5] 王玉正, 袁永兰, 赵百灵, 等. 山东省小麦纹枯病危害损失及防治指标研究[J]. 植物保护学报, 1997, 24(1): 44-48
- [6] Lay F T, Anderson M A. Defensins-components of the innate immune system in plants[J]. Curr Protein Pept Sci, 2005, 6(1): 85-101
- [7] Lacerda A F, Vasconcelos E A, Pelegri P B, et al. Antifungal defensins and their role in plant defense[J]. Front Microbiol, 2014, 5(5): 116
- [8] Vriens K, Cammue B P, Thevissen K. Antifungal plant defensins: mechanisms of action and production[J]. Molecules, 2014, 19(8): 12280-12303
- [9] Landon C, Sodano P, Hetru C, et al. Solution structure of drosomy-
- cin, the first inducible antifungal protein from insects[J]. Protein Sci, 1997, 6(9): 1878-1884
- [10] Yount N Y, Yeaman M R. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides[J]. PNAS, 2004, 101(19): 7363-7368
- [11] Valente A P, de Paula V S, Almeida F C. Revealing the properties of plant defensins through dynamics[J]. Molecules, 2013, 18(9): 11311-11326
- [12] Penninckx I A, Thomma B P, Buchala A, et al. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 1998, 10(12): 2103-2113
- [13] Epple P, Apel K, Bohlmann H. ESTs reveal a multigene family for plant defensins in *Arabidopsis thaliana*[J]. FEBS Lett, 1997, 400(2): 168-172
- [14] Thomma B P H J, Broekaert W F. Tissue-specific expression of plant defensin genes *PDF2.1* and *PDF2.2* in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Physiol Biochem, 1998, 36(7): 533-537
- [15] Segura A, Moreno M, Madueo F, et al. Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens[J]. MPMI, 1999, 12(1): 16-23
- [16] Almasia N, Bazzini A, Hopp H E, et al. Overexpression of snakin1 gene enhances resistance to *Rhizoctonia solani* and *Erwinia carotovora* in transgenic potato plants[J]. Mol Plant Pathol, 2008, 9(3): 329-338
- [17] 蒋雯, 刘欣, 张增艳. 马铃薯抗菌肽 *SN1* 基因的克隆、原核表达及其抑菌活性[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(2): 286-290
- [18] 王金凤, 杜丽璞, 李钊, 等. 抗纹枯病、根腐病的转 *SN1* 基因小麦的获得与鉴定[J]. 作物学报, 2012, 38(5): 773-779
- [19] Rong W, Qi L, Wang J F, et al. Expression of a potato antimicrobial peptide *SN1* increases resistance to take-all pathogen *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in transgenic wheat[J]. Funct Integr Genomics, 2013, 13(3): 403-409
- [20] Terras F R G, Goderis I J, Leuven F V, et al. In vitro antifungal activity of a radish (*Raphanus sativus*) seed protein homologous to nonspecific lipid transfer proteins[J]. Plant Physiol, 1992, 100(2): 1055-1058
- [21] Terras F R G, Eggermont K, Kovaleva V, et al. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense[J]. Plant Cell, 1995, 7(5): 573-588
- [22] Aerts A M, Francois I E J A, Meert E M K, et al. The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*[J]. J Mol Microb Biotech, 2007, 13(4): 243-247
- [23] 路妍, 刘宝业, 井金学, 等. 抗菌肽 Rs-AFP2 的原核表达及抑菌活性[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(1): 84-88
- [24] Jha S, Chattoo B B. Expression of a plant defensin in rice confers resistance to fungal phytopathogens[J]. Transgenic Res, 2010, 19(3): 373-384
- [25] Li Z, Zhou M P, Zhang Z Y, et al. Expression of a radish defensin in transgenic wheat confers increased resistance to *Fusarium graminearum* and *Rhizoctonia cerealis*[J]. Funct Integr Genomics, 2011, 11(1): 63-70
- [26] 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 Physiol, 2005, 138(4): 2165-2173
- [27] Hein I, Barciszewska-Pacak M, Hrubikova K, et al. Virus-induced gene silencing-based functional characterization of genes associated with powdery mildew resistance in barley[J]. Plant Physiol, 2005, 138(4): 2155-2164
- [28] Petty I T, Hunter B G, Wei N, et al. Infectious barley stripe mosaic virus RNA transcribed in vitro from full-length genomic cDNA clones[J]. Virology, 1989, 171(2): 342-349
- [29] Fu Y P, Duan X Y, Tang C L. TaADF7, an actin-depolymerizing

- factor, contributes to wheat resistance against *Puccinia striiformis* f. sp. *Tritici* [J]. *Plant J*, 2014, 78(1): 16-30
- [30] Zhu X L, Qi L, Liu X. The wheat ethylene response factor transcription factor pathogen-induced ERF1 mediates host responses to both the necrotrophic pathogen *Rhizoctonia cerealis* and freezing stresses[J]. *Plant Physiol*, 2014, 164(3): 1499-1514
- [31] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [32] Holzberg S, Brosio P, Gross C, et al. Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant [J]. *Plant J*, 2002, 30(3): 315-327
- [33] Zhou H B, Li S F, Deng Z Y, et al. Molecular analysis of three new receptor-like kinase genes from hexaploid wheat and evidence for their participation in the wheat hypersensitive response to stripe rust fungus infection[J]. *Plant J*, 2007, 52(3): 420-434
- [34] 周森平, 杨学明, 姚金保, 等. 转 *Gastrodinin* 基因提高小麦赤霉病和纹枯病的抗性[J]. *作物学报*, 2012, 38(8): 1617-1624
- [35] Persson P, Ehmke H, Kirchheim H. Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin,  $\gamma$ -hordothionin from barley endosperm [J]. *Eur J Biochem*, 1990, 194(2): 533-539
- [36] Colilla F J, Rocher A, Mendez E.  $\gamma$ -Purothionins; amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm [J]. *FEBS Lett*, 1990, 270(1/2): 191-194
- [37] Koike M, Okamoto T, Tsuda S, et al. A novel plant defensin-like gene of winter wheat is specifically induced during cold acclimation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 298(1): 46-53
- [38] Sasaki K, Kuwabara C, Umeki N, et al. The cold-induced defensin TAD1 confers resistance against snow mold and *Fusarium* head blight in transgenic wheat [J]. *J Biotechnol*, 2016, 228: 3-7
- [39] Garcia-Olmedo F, Alamillo J M, Rodriguez-Palenzuela P, et al. Plant defense peptides [J]. *Biopolymers*, 1998, 47(6): 479-491
- [40] Kragh K M, Nielsen J E, Nielsen K K, et al. Characterization and localization of new antifungal cysteine-rich proteins from *Beta vulgaris* [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 1995, 8(3): 424-434

## 欢迎订阅 2018 年《作物学报》中、英文版

《作物学报》是中国科学技术协会主管、中国作物学会和中国农业科学院作物科学研究所共同主办、科学出版社出版的有关作物科学的学术期刊。本刊从 2001 年起连续 15 年被中国科技信息研究所授予“百种中国杰出学术期刊”称号。2013 年和 2015 年被国家新闻出版广电总局评为“百强科技期刊”，2011 年和 2017 年获“第二届中国出版政府奖期刊奖提名奖”。本刊主要刊载农作物遗传育种、耕作栽培、生理生化、种质资源以及与作物生产有关的生物技术、生物数学等学科具有基础理论或实践应用性的原始研究论文、专题评述和研究简报等。

月刊, 每期定价 60 元, 全年 720 元。可通过全国各地邮局订阅, 刊号: ISSN 0496-3490, CN 11-1809/S, 邮发代号: 82-336, 也可直接向编辑部订购。

*The Crop Journal* (《作物学报(英文版)》) 是中国科协主管, 中国作物学会、中国农业科学院作物科学研究所和中国科技出版传媒股份有限公司共同主办的学术期刊。本刊目前被 ESCI 数据库、Scopus 数据库、美国化学文摘(CA)、英国国际农业与生物科学研究中心文摘(CABI)、英国食品科学与技术文摘、联合国粮农组织的 AGRIS 数据库、DOAJ、中国科学引文数据库(CSCD)等收录。本刊主要刊登农作物遗传育种、耕作栽培、生理生化、生态、种质资源以及与农作物有关的生物技术、生物数学、农业气象等领域以第一手资料撰写的研究论文、研究简报以及专题综述等。2016 年被中国科学技术信息研究所评选为“中国科技核心期刊”, 被中国知网评选为“2016 中国最具国际影响力学术期刊”。

双月刊, 每期定价 60 元, 全年 360 元。全国各地邮局均可订阅, 刊号: CN 10-1112/S, ISSN 2095-5421, 2214-5141 (Online), 邮发代号: 80-668, 也可向编辑部直接订购。

地址: 北京市海淀区中关村南大街 12 号中国农业科学院作物科学研究所《作物学报》编辑部

邮编: 100081

电话: 010-82108548; 010-82105793

网址(中文刊): <http://zwx.chinacrops.org/>

E-mail(中文刊): [zwx301@caas.cn](mailto:zwx301@caas.cn)

网址(英文刊): <http://www.sciencedirect.com/science/journal/22145141>

E-mail(英文刊): [cropjournal@caas.cn](mailto:cropjournal@caas.cn)