

福建农林大学

硕士学位论文

番茄抗叶霉菌相关基因的鉴定及TRV 16K基因的功能分析

姓名：郑璐平

申请学位级别：硕士

专业：分子病毒学

指导教师：吴祖建;蔡新忠

20070401

独创性声明

本人声明，所提交的学位（毕业）论文，是本人在指导教师的指导下独立完成的研究成果，并且是自己撰写的。尽我所知，除了文中作了标注和致谢中已作了答谢的地方外，论文中不包含其他人发表或撰写过的研究成果。与我一同对本研究做出贡献的同志，都在论文中作了明确的说明并表示了谢意，如被查有侵犯他人知识产权的行为，由本人承担应有的责任。

学位（毕业）论文作者亲笔签名：郑明平 日期：2007.05

论文使用授权的说明

本人完全了解福建农林大学有关保留、使用学位（毕业）论文的规定，即学校有权送交论文的复印件，允许论文被查阅和借阅；学校可以公布论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

保密，在 年后解密可适用本授权书。

不保密，本论文属于不保密。

学位（毕业）论文作者亲笔签名：郑明平 日期：2007.05

指导教师亲笔签名：吴明 日期：2007.5

摘要

基因对基因抗性是植物抗病性的重要表现形式。番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 与叶霉菌 (*Cladosporium fulvum*) 系统是研究基因对基因抗性的模式系统。番茄抗病基因 *Cf* 和互补的叶霉菌无毒基因 *Avr* 进行识别互动, 激活下游信号传导途径, 活化防卫反应, 导致番茄对叶霉菌抗性的产生, 关键信号传导基因的分离和功能分析将增进对番茄对叶霉菌抗性机理的理解。病毒诱导的基因沉默 (Virus induced gene silencing, VIGS) 是近年发展起来的一种研究植物基因功能的强有力工具, 已被广泛应用于植物抗病性、生长发育及代谢调控相关基因的功能研究。由烟草脆裂病毒 (*Tobacco rattle virus*, TRV) 改造成的载体是目前利用最广泛的VIGS载体。pTRV1中16K ORF在TRV介导的基因沉默中的作用尚不明确。

本论文研究内容包括两部分。第一部分, 从本实验室已克隆的 *ACE* (*Avr/Cf* elicited) 基因片段, 即 *Cf/Avr* 介导产生过敏性反应时特异表达的cDNA-AFLP片段, 中挑选6个具代表性的片段, 采用VIGS技术鉴定这些片段对应基因在 *Cf-4/Avr4* 介导产生过敏性反应中的作用, 筛选获取可能起重要作用的基因。第二部分, 构建缺失16K ORF的pTRV1表达结构, 将缺失型TRV与野生型TRV诱导基因沉默效果进行比较分析, 明确pTRV1的16K ORF在基因沉默中的作用。所获主要结果如下:

1、初步明确了6个 *ACE* 片段相应基因在 *Cf-4/Avr4* 介导产生过敏性反应中的作用。根据对本实验室已克隆的182个 *ACE* 片段进行的生物信息学基因功能预测结果, 挑选其中6个, 即 *ACE* 片段5、14、39、85、95和111, 供基因沉默分析。*ACE5* 和 *ACE95* 片段相应基因功能未知, *ACE14*、*ACE39*、*ACE85*、*ACE111* 片段分别与钙依赖蛋白磷酸酶 (Calcineurin)、40S核糖体蛋白S13、含LRR蛋白激酶、HR指示蛋白HSR203J有显著序列同源性。构建了插入这些片段供VIGS分析用的重组质粒。进行了TRV介导的VIGS分析和 *Cf-4/Avr4* 介导的HR检验。结果表明, *ACE14*、*ACE85*、*ACE111* 基因的沉默抑制植株生长, 导致叶片畸形, 因此这些基因可能与植株生长发育相关; *ACE95* 基因的沉默显著抑制 *Cf-4/Avr4* 介导的HR的产生, 说明 *ACE95* 相应基因可能在番茄抗叶霉病中起重要作用。

2、明确了pTRV1中16K ORF对TRV介导基因沉默的影响。利用 *Spe I* 和 *Stu I* 构建了缺失16K ORF的pTRV1表达结构。比较分析了野生型TRV和缺失16K ORF的TRV

载体介导的基因沉默效率。结果表明,在本氏烟中,缺失型TRV介导的基因沉默比野生型TRV更完全,基因完全沉默的植株百分率比野生型TRV增加了16%。在三生烟中,无论野生型还是缺失型TRV介导产生的基因沉默效率均很低,缺失型TRV介导产生的基因沉默效率相对更高。此外,转化缺失型TRV结构的农杆菌接种后,植株接种叶和上部非接种叶中TRV的积累量均显著低于野生型结构转化菌接种植株。这些结果说明,pTRV1中16K ORF在病毒的增殖中起重要作用,而且是TRV介导的基因沉默的弱抑制子。

关键词: 番茄 (*Lycopersicon esculentum*); 番茄叶霉菌 (*Cladosporium fulvum*); Cf; Avr; 抗病性; 过敏性反应(HR); 病毒诱导的基因沉默(VIGS); 烟草脆裂病毒(TRV); 本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*); 基因沉默抑制子

Abstract

Gene-for-gene resistance is an important type of plant disease resistance. The pathosystem of tomato (*Lycopersicon esculentum*) and its leaf mould fungal pathogen *Cladosporium fulvum* is a model system to study gene-for-gene resistance. The recognition of *C. fulvum* avirulence gene product Avr by tomato resistance gene product Cf initiates downstream signal transduction, which activates defence responses, resulting in the Cf-dependent resistance to *C. fulvum*. Isolation and further functional analysis of key signalling components will provide great insights into the mechanism of Cf-dependent resistance. Virus induced gene silencing (VIGS) has recently emerged as a powerful method for gene function study. It has been broadly used in the function analysis of genes involved in disease resistance, growth and development, and metabolism. The TRV vector modified from the RNA virus *Tobacco rattle virus* (TRV) is the most frequently used VIGS vector. However, effect of the 16K open reading frame (ORF) of pTRV1 on VIGS is still unclear.

This thesis study comprises two parts of contents. In the first part, six *ACE* (*Avr/Cf* elicited) gene fragments, which are the cDNA-AFLP fragments corresponding to genes specifically expressed during *Cf/Avr*-dependent hypersensitive response (HR), were chosen as representatives for VIGS analysis to elucidate their possible roles in *Cf-4/Avr4*-dependent HR, and thereby screened out the one(s) required for *Cf-4/Avr4*-dependent HR. While in the second part, modified pTRV1 expression construct in which the 16K ORF was deleted, was made. To investigate the role of the 16K ORF in gene silencing, efficiency of VIGS induced by the deletion mutant and the wild type vectors was compared. The main results are as follows:

- 1、The role of the genes corresponding to the six *ACE* gene fragments in *Cf-4/Avr4*-dependent HR was identified. Function of the genes corresponding to the *ACE* fragments was predicted based on sequence homology analysis. Six *ACE* fragments, i.e. Fragments 5、14、39、85、95 and 111, were chosen for VIGS analysis. Function of genes *ACE5* and *ACE95* was unknown, while products of genes *ACE14*、*ACE39*、*ACE85* and *ACE111* have significant sequence homology to a calcineurin-like phosphatase, a 40S

robosomal protein S13, a LRR-containing protein kinase and a HR marker HSR20 protein respectively. The recombinant pYL156 plasmids with the insertion of these *ACE* fragments were constructed. VIGS analysis using these constructs followed by analysis of *Cf-4/Avr4*-dependent HR was conducted. Plants in which genes *ACE14*, *ACE85* and *ACE111* were silenced respectively showed growth retardation and organ deformation, indicating that these genes may be involved in plant growth and development. *Cf-4/Avr4*-dependent HR was severely repressed in *ACE95*-silenced plants, revealing that *ACE95* may be essential for *Cf-4/Avr4*-dependent HR and resistance.

2、The effect of the 16K ORF of pTRV1 on gene silencing induction was analyzed. The pTRV1 expression construct with deletion of the 16K ORF was made using *Spe* I and *Stu* I sites. Efficiency of gene silencing induced by the deletion mutant and the wild type TRV vectors was comparatively studied. *PDS* gene silencing induced by the deletion mutant TRV vector was more complete compared with that by the wild type TRV vector. The percentage of completely silenced *N. benthamiana* plants out of total silenced plants induced by the deletion mutant vector was 16% higher than that by the wild type TRV vector. Neither the deletion mutant vector nor the wild type TRV vector induced efficient *PDS* gene silencing in *N. tabacum* cv. Samsun. However, efficiency of silencing induced by the deletion mutant vector was relatively higher than that by the wild type TRV vector. Additionally, TRV RNA accumulated at a significantly lower level in both inoculation and up uninoculated leaves of plants inoculated with *Agrobacterium* carrying the deletion mutant vector compared with plants inoculated with *Agrobacterium* carrying the wild type vector. These results demonstrate that the 16K ORF of pTRV1 plays an important role in TRV virus multiplication, and possibly acts as a weak suppressor of TRV-induced gene silencing in plants.

Key words: *Lycopersicon esculentum*; *Cladosporium fulvum*; *Cf*; *Avr*; Disease resistance; hypersensitive response (HR); Virus induced gene silencing (VIGS); *Tobacco rattle virus* (TRV); *Nicotiana benthamiana*; Suppressor of gene silencing

第一章 文献综述

1 番茄与叶霉菌的互作

1.1 引言

番茄叶霉菌 (*Cladosporium fulvum* Cooke, syn. *Fulvia fulva*) 为半知菌亚门芽枝霉属真菌。番茄与叶霉病的互作遵守基因对基因 (gene-for-gene) 假说 (Flor, 1971), 是研究植物和病原物互作分子机理的模式系统。7 个番茄抗叶霉菌基因 *Cf-2*, *Cf4*, *Cf-4E*, *Cf-5*, *Cf-9*, *Hcr9-9B* 和 *9DC*, 以及 4 个叶霉菌无毒 (avirulence, *Avr*) 基因 *Avr2*, *Avr4*, *Avr4E* 和 *Avr9* 已分别得到克隆。因此, 该互作系统中已有多达 4 对 *R/Avr* 互补基因对得到克隆, 是现有植物与真菌互作系统中 *R/Avr* 互补基因对被克隆最多的系统。

1.2 番茄抗叶霉菌基因 (*Cf*)

自从第一个抗病基因 *Pto* 被克隆以来, 迄今已相继克隆了几十个分别介导植物对真菌、细菌、卵菌、病毒和线虫的抗病基因 (Martin *et al.*, 2003)。大多数 *R* 基因编码产物都具有保守的结构域, 这些结构域包括: 富含亮氨酸重复单元 (leucine rich repeat, LRR)、核苷酸结合域 (nucleotide-binding site, NBS)、果蝇 (*Drosophila*) Toll 蛋白和哺乳动物白细胞介素 1 受体同源域 (Toll/interleukin-1 receptor homology region, TIR)、卷曲螺旋域 (coiled coil, CC)、蛋白激酶域 (protein kinase, PK)、WRKY 结构域、PEST (Pro-Glu-Ser-Thr) 结构域和 ECS (endocytosis signal) 结构域、核定位信号 (nuclear localization signal, NLS) 等。除个别与病原物毒素专化性相关的 *R* 基因外, 多数 *R* 基因编码产物含 NBS 和 LRR 结构域 (Hammond-Kosack and Parker, 1994; Swiderski and Innes, 2001; Tameling *et al.*, 2002)。

目前已克隆和鉴定的 7 个 *Cf* 基因编码产物均为定位于细胞质膜但主体在膜外的 eLRR-TM 类蛋白。不同 *Cf* 蛋白具有的 eLRR 结构域中 LRR 单元拷贝数不同。eLRR 单元拷贝数决定了 *Cf-4*, *Cf-9*, *Cf-2* 和 *Cf-5* 识别特异性 (Van der Hoorn *et al.*, 2001a; Seear and Dixon, 2003)。*Cf-4* 和 *Cf-9* 是目前研究较为深入的两个抗病基因, 均位于染色体 1 号短臂上, 属于 *Hcr9* 基因家族 (Parniske *et al.*, 1999)。两者有 90% 以上氨基酸序列一致。两者的区别在于 *Cf-4* 比 *Cf-9* 少了相当于 *Cf-9* 第 11 和 12 个 LRR 的序列。另外 *Cf-4* 在 B 结构域缺失 10 个氨基酸, 其它 68 个差异氨基酸位于蛋白 N 端,

其中在 A、B、LRR 结构域中分别为 6、4、57 个。而 57 个 LRR 氨基酸突变中, 32 个位于假设的溶媒暴露性位点中 (Jones *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 1997)。

关于 Cf 蛋白的细胞定位尚有争论。Cf 基因编码产物 N 端有潜在的将成熟产物分泌于细胞间隙的信号肽, 而 C 端则有潜在的将成熟产物定位于内质网上的双赖氨酸基序 (KKRY)。Benghezal 等 (2000) 报道在烟草和拟南芥超表达的 Cf-9 蛋白定位于内质网 (Benghezal *et al.*, 2000), 而 Piedras 等 (2000) 则报道在烟草中超表达的 Cf-9 蛋白定位于质膜 (Piedras *et al.*, 2000)。随后 Van der Hoorn 等 (2001b) 发现 Cf-9 中双赖氨酸基序并非 Cf-9 功能所必需, 它有可能被其互作蛋白所遮挡 (Van der Hoorn *et al.*, 2001b)。因此, Cf-9 蛋白很可能定位于质膜上, 而超表达 Cf-9 可能由于量太大, 没能完全被互作蛋白所完全遮挡, 因而定位于内质网上。这个假设最近已得到证实, Wilson 等发现内质网定位的 Avr9 的 HR 诱发能力显著降低, 证明 Cf-9 对 Avr9 的识别发生于质膜上 (Wilson *et al.*, 2005)。

1.3 番茄叶霉菌 Avr 基因

在番茄叶霉菌中, 已有 4 个 Avr 基因被克隆, 它们分别是 Avr2, Avr4, Avr4E 和 Avr9, 其中 Avr9 和 Avr4 是最早从真菌中克隆到的 Avr 基因, 而 Avr4E 则到最近才得到克隆。所有已克隆的 Avr 基因编码一个具有使产物锚定于胞外的信号序列的蛋白前体 (Joosten *et al.*, 1997; Luderer *et al.*, 2002; Westerink *et al.*, 2004)。这些 Avr 基因编码的产物与已知蛋白没有明显的同源性, 但具有以下结构特征: (1) 均含偶数个半胱氨酸, 可能形成二硫键 (Van den Hooven *et al.*, 2001), 在 HR 诱导中起重要作用 (Kooman Gersmann *et al.*, 1997; Joosten *et al.*, 1997); (2) 均含信号肽, 使成熟产物能被分泌到细胞间隙, 否则将失去 HR 诱导能力 (Wilson *et al.*, 2005); (3) 均为小分子量蛋白。Avr2, Avr4, Avr4E 和 Avr9 成熟蛋白分别含 58, 86, 101 和 28 个氨基酸 (Van Kan *et al.*, 1991; Luderer *et al.*, 2002; Westerink *et al.*, 2004; Joosten *et al.*, 1994)。

Avr 在毒性菌株中的存在与否及存在方式各不相同。在毒性小种中, Avr9 完全缺失 (Van Kan *et al.*, 1991), Avr4 缺失或产生点突变 (Joosten *et al.*, 1997), Avr2 以截短 (truncated) 形式 (Luderer *et al.*, 2002), 而 Avr4E 则以缺失或稳定的突变形式 (Phe⁸²Leu 和 Met⁹³Thr) 存在 (Westerink *et al.*, 2004), 说明 *C. fulvum* 通过完全不同的策略克服不同 Cf 抗病基因决定的抗性。

Avr9 和 Avr4 除被 Cf-9 和 Cf-4 识别诱发抗病性外, 还有对 *C. fulvum* 生存有利的

作用。虽然功能性 *Avr9* 的缺失并没有改变 *C. fulvum* 的致病性 (Marmeisse *et al.*, 1993), 但氮素的限制诱发 *Avr9* 的表达, 说明 *Avr9* 可能在 *C. fulvum* 的氮素代谢中起调节作用。另外, *Avr4* 已被证明具有几丁质结合活性, 它与叶霉菌细胞壁的几丁质相结合, 避免被植物几丁质酶降解。叶霉菌中自然存在的点突变形式的 *Avr4*, 一方面可以避免被 *Cf-4* 识别, 另一方面仍然具有几丁质结合活性, 说明 *Avr4* 的这种活性在保护叶霉菌中起重要作用 (Van den Burg *et al.*, 2003)。其它两个已克隆的 *C. fulvum* 无毒基因 *Avr2* 和 *Avr4E* 的毒性作用尚未见公开研究报告。

1.4 番茄 *Cf* 蛋白对叶霉菌 *Avr* 蛋白的识别

在番茄和叶霉菌系统中, 完全互补的 *R/Avr* 基因对 *Cf-9/Avr9* (Van den Ackerveken *et al.*, 1992; Jones *et al.*, 1994)、*Cf-4/Avr4* (Joosten *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 1997)、*Cf-2/Avr2* (Dixon *et al.*, 1996; Luderer *et al.*, 2002) 和 *Cf-4E/Avr-4E* (Takken *et al.*, 1998; Westerink *et al.*, 2004) 已被克隆。*Avr* 识别特异性主要存在于 *Cf* 蛋白的 N 端。LRR 重复单元数目的改变显著影响 *Cf* 功能。N 端 LRR 旁邻结构域中的色氨酸和半胱氨酸以及多个糖基化位点可能是 *Cf-9* 识别特异性的重要决定位点 (Van der Hoorn *et al.*, 2005)。而 B 结构域及位于第 13, 14 和 16 个 LRR 单元的 W389, G411 和 F457 氨基酸则是 *Cf-4* 识别特异性的重要决定因子 (Van der Hoorn *et al.*, 2001a; Wulff *et al.*, 2001)。

最近研究结果表明, *Cf-2* 对 *Avr2* 的识别遵守“保卫”假说 (the “guard” hypothesis)。突变体筛选分析发现蛋白酶 *Rcr3* 为 *Avr2/Cf-2* 决定的抗病性所必需 (Kruger *et al.*, 2002; Dixon *et al.*, 2000)。*Avr2* 对 *Rcr3* 的蛋白酶活性的抑制, 是激活 *Cf-2* 介导的下游防卫反应和抗病性的充分必要条件 (Rooney *et al.*, 2005), 因此, *Rcr3* 是 *Cf-2* 的保卫对象。但是, *Avr2* 与 *Rcr3* 的互作如何激活 *Cf-2*, *Cf-2* 和 *Rcr3* 能否直接结合等尚不明确。另外, *Avr2* 除抑制 *Rcr3* 外, 还能抑制其它蛋白酶活性。这些结合活性的生物学意义也有待进一步研究。

关于 *Cf-4* 和 *Cf-9* 对 *Avr4* 和 *Avr9* 的识别, 至今尚未找到直接结合识别的证据 (Luderer *et al.*, 2001)。*Cf-2/Avr2* 间接识别互作的发现更预示着其他 *Cf* 蛋白也可能通过类似的间接互作方式识别相应的 *Avr*, 激活下游防卫反应。证明这种假设的关键在于找到所谓的“被保卫”蛋白, 即与 *Avr* 或 *Cf*, 或同时与两者结合的蛋白。对于 *Cf-9*, HABS (high-affinity binding site) 可能充当该蛋白的角色。因为与 *Avr9* 和 *Cf-9* 有效识别互作定位于质膜相一致, *Avr9* 高亲和性结合位点 HABS 也定位于质膜

(Kooman-Gersmann *et al.*, 1996)。而且, Avr9 与 HABS 的结合能力与 Avr9/Cf-9 介导的 HR 呈紧密正相关 (Kooman-Gersmann *et al.*, 1998)。

另外, 已有两个 Cf-9 结合蛋白被分离。一个是泡囊相关蛋白 VAP27 (vesicle-associated protein 27)。该蛋白通过以 Cf-9 蛋白的 EFG 结构域为钓饵的双杂交方法分离获得 (Laurent *et al.*, 2000)。VAP27 可能定位于质膜, C 端与哺乳动物 VAP33 蛋白高度相似。VAP33 通过与泡囊膜蛋白的互作参与各类分子的膜运输 (membrane trafficking)。而 VAP27 的 N 端则与 MSP 蛋白 (major sperm protein) 中的 CC 基序相似。MAP 参与蛋白间互作, 并激活膜泡囊的移动。因此, Cf-9 互作蛋白 VAP33 可能参与 Cf-9 识别蛋白复合体中某个(些)组分的细胞内吞 (endocytosis), 从而活化下游防卫反应。但 VAP27 在 Cf-9 介导的抗性中的作用尚未得到验证。另一个 Cf-9 结合蛋白是硫氧还蛋白 CITRX (Cf-9-interacting thioredoxin) (Rivas *et al.*, 2004)。CITRX 通过以 Cf-9 C 端 33 个氨基酸为钓饵的双杂交方法分离获得。研究表明, CITRX 是 Cf-9, 但不是 Cf-2 介导的 HR 和抗病性的负调控因子。最近发现, CITRX 与 Cf-9 介导的抗病性关键因子 ACIK 蛋白激酶直接互作, 因此推测 CITRX 可能充当 Cf-9 与下游信号传导因子 ACIK 的接头的作用, 将两者连接起来, 活化下游信号传导途径 (Nekrasov *et al.*, 2006)。

最近 Wulff 等发现, 在没有 *Avr* 情况下, 经人为基因改造形成的, 以及从野生型番茄中分离到的变异 *Cf-9* 基因, 在烟草属植物中的过量表达导致类似 HR 的坏死 (Wulff *et al.*, 2004)。这些类 *Cf-9* 基因诱导产生坏死的信号传导途径与 *Cf-9* 相似。而且它们在烟草属不同种植株上诱发的坏死强度不同, 说明它们可能与这些植物中充当激发子的不同植物因子产生互作。也可能与同一因子互作, 但这因子在不同种植物中表现多态性。

1.5 Cf/Avr 互作下游信号传导和防卫反应的激活

Cf 识别 Avr 后迅速激活下游信号传导和防卫反应。早期的防卫反应包括 HR 的产生和活性氧的积累 (De Jong *et al.*, 2000; Peever and Higgins, 1989; May *et al.*, 1996)。活性氧的积累导致膜脂过氧化和细胞膜的破坏, 以及随后电解质的渗漏 (Peever and Higgins, 1989; May *et al.*, 1996)。

在 Cf/Avr 互作体系中, Cf-9/Avr9 识别互作激发的下游防卫反应信号传导的研究相对较为深入。研究发现, 氧化迸发、钙依赖性蛋白激酶、MAPK 激酶和钾离子

通道参与 Cf-9/Avr9 下游防卫反应的调控(Piedras *et al.*,1998; Blatt *et al.*,1999; De Jong *et al.*,2000; Romeis *et al.*,1999, 2000 and 2001)。最近研究表明, 硫氧还蛋白(thioredoxin) 负向调控 Cf-9/Avr9 介导的 HR (Rivas *et al.*, 2004)。转录本积累分布型(transcript profiling) 研究表明, Cf-9/Avr9 识别互作导致 290 个片段相应基因的表达发生改变(Durrant *et al.*, 2000)。通过 VIGS 技术进一步鉴定明确, 其中一个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶基因 *ACIK1*, 在 Cf-9 介导的 HR 和抗病性中起重要作用(Rowland *et al.*, 2005)。与 Cf-9 相比, 其它 Cf 介导的防卫信号传导方面的研究相对较少。已经明确的重要因子包括 Rcr3 和磷脂酸途径。Rcr3 编码番茄分泌型半胱氨酸蛋白酶, 为 Cf-2/Avr2 介导的 HR 产生所必需。而磷脂酸的积累可能与 Cf-4/Avr4 下游信号传导有关(Kruger *et al.*, 2002; De Jong *et al.*, 2004)。

随着基因沉默(gene silencing) 等新技术的应用, Cf-9 和 Cf-4 下游信号传导基因的鉴定和克隆研究已取得重大进展。已被鉴定和克隆的重要信号传导基因包括 MAP 激酶基因 *WIPK* 和 *SIPK*(Romeis *et al.*, 2000), 钙依赖性蛋白激酶基因 *NtCDPK2* (Romeis *et al.*, 2001); *SGT1*(Peart *et al.*, 2002b); 硫氧还原蛋白基因 *CITRX* (Rivas *et al.*, 2004); 以及丝/苏氨酸蛋白激酶基因 *LeACIK1* (Rowland *et al.*, 2005; Wulff *et al.*, 2004)。最近发现, 泛素 E3 连接酶基因 *NtCMPG1* 为 Cf-9 介导的 HR 和抗病性所必需(Gonzalez-Lamothe *et al.*, 2006)。

2 病毒诱导的基因沉默及其在植物基因功能鉴定中的作用

2.1 引言

RNA介导的基因沉默(RNA-mediated gene silencing) 是一种基于核酸水平高度保守的特异性降解过程, 它广泛存在于各种生物中, 在线虫和动物中称为RNA干扰(RNA interfering, RNAi), 在真菌中称为基因消除(gene quelling), 在植物中称为转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS) (Voinnet, 2001)。病毒诱导的基因沉默(virus induced gene silencing, VIGS) 是PTGS的一种, 是指携带植物功能基因cDNA片段的重组病毒, 在侵染植物体后诱导植物发生基因沉默而出现表型突变, 从而可以通过植物表型或生理指标上的变化反映该基因的功能。

2.2 病毒诱导的基因沉默 (VIGS)

2.2.1 VIGS 的发现与建立

VIGS 现象最早在 RNA 病毒中发现。1995 年, Kumagai 等在烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 中插入一段八氢番茄红素脱氢酶 (phytoene desaturase, *PDS*) cDNA 片段, 当带有该 cDNA 片段的 TMV 重组病毒侵染烟草后, 侵染的叶片变成白色 (Kumagai *et al.*, 1995)。PDS 是类胡萝卜素合成所必需的酶, 具保护叶绿素免受光漂白的作用, 当 PDS 基因发生沉默后, PDS mRNA 水平显著降低, 导致类胡萝卜素合成途径被阻断, 使被侵染植物表现出白化效应。1998 年, Baulcombe 等在马铃薯 X 病毒 (*Potato virus X*, PVX) 基因组上插入一段 PDS cDNA, 重组病毒侵染植物后也出现白化效应。他们认为 VIGS 可以有效地抑制植物内源基因的表达, 从而利用病毒载体进行未知基因的功能鉴定 (Ruiz *et al.*, 1998)。但是 PVX 载体诱导基因沉默的效率并不高, 沉默后持续时间也不长, 在本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*) 上会出现严重的病毒症状。2001 年, Baulcombe 等人又报道了以烟草脆裂病毒 (*Tobacco rattle virus*, TRV) 为载体的 VIGS 体系, 并比较了 TRV 和 PVX 载体诱导转基因 *GFP*、转基因 *GUS*、内源基因 *PDS*、*Rubisco* 小亚基和 *LEAFY* 开花基因发生基因沉默的效率和持续时间, 研究发现无论在抑制转基因还是内源基因的表达上, TRV 载体诱导基因沉默的效率和持续性都优于 PVX 载体, 同时, TRV 载体产生的病毒症状也轻于 PVX (Ratcliff *et al.*, 2001)。2002 年, Holzberg 等利用大麦线条花叶病毒 (*Barley stripe mosaic virus*, BSMV) 首次在单子叶植物大麦上成功抑制了 PDS 基因的表达 (Holzberg *et al.*, 2002)。2004 年又报道了菜豆早期褐色病毒 (*Pea early browning virus*, PEBV) 载体, 这是第一个可应用于豆科植物(碗豆)基因沉默的 VIGS 载体 (Constantin *et al.*, 2004)。TRV 是目前应用最广的 VIGS 载体, 被广泛应用于本氏烟, 番茄, 拟南芥和马铃薯等多种植物。TRV 载体目前有三个版本, 即最早由 Ratcliff 等 (Ratcliff *et al.*, 2001) 构建的版本, Liu 等 (Liu *et al.*, 2002) 的改进版本 pYL156 和 pYL279, 以及最近 Valentine 等 (2004) 的 TRV-2b 版本。Liu 等 (2002) 版本插入了双倍 35S CaMV 启动子以及 C 端插入一个核酶, 导致更有效的病毒 RNA 的产生。而 TRV-2b 与前两个版本区别在于 TRV-2b 保留了 TRV RNA2 中的 2b 基因序列。不同版本的 TRV 载体在适用植物范围及可沉默植物组织等方面有显著区别。Ratcliff 等 (2001) 版本目前只用于本氏烟和 *Solanum* 属的三个种; pYL156 则除了在本氏烟和 *Solanum* 属的两个种外, 还可适用于番茄, 烟草 (有些种只在农杆菌灌根接种时

有效), 辣椒等科作物, 但却不能诱发 *S. tuberosum* cv. Cara 产生有效的基因沉默 (Brigneti *et al.*, 1998)。而 TRV-2b 则导致植物根部和顶端分生组织中产生比上述两种 TRV 载体应用时更高的基因沉默效果 (Valentine *et al.*, 2004)。

与上述 RNA 病毒类似, DNA 病毒也能诱导基因沉默。1998 年, 北卡罗那州立大学 Robertson 研究组利用双生病毒科的番茄金花叶病毒 (*Tomato golden mosaic virus*, TGMV) DNA-A 为载体, 在本氏烟上成功诱导了镁离子螯合酶关键基因 *Su* (Sulfur) 和转基因 *luc* 荧光蛋白基因沉默, *Su* 基因与叶绿素合成密切相关, 因此该基因被沉默后, 叶片成黄色, 而 *luc* 荧光蛋白基因被沉默后, 该植株不再散发荧光, 初步建立了以 DNA 病毒诱导的基因沉默研究植物病毒功能的体系 (Kjemtrup *et al.*, 1998)。但是 TGMV DNA-A 载体诱导基因沉默后的效率比较低, 并且病毒本身会产生严重的病毒症状。因此 2001 年, Robertson 研究组又报道了以 TGMV DNA-B 为载体的 VIGS 体系, 该载体在基因沉默效率和持久性上都比 DNA-A 载体提高, 在植株中产生的病毒症状也有所减轻 (Peele *et al.*, 2001)。2002 年, Turnage 等利用大白菜曲叶病毒 (*Cabbage leaf curl virus*, CbLCV) 在拟南芥上成功建立了 VIGS 体系 (Turnage *et al.*, 2002)。非洲木薯花叶病毒 (*African cassava mosaic virus*, ACMV) 是最近报道的 VIGS 载体。上述三种均为单链环形 DNA 病毒, 由 DNA-A 和 DNA-B 两种组分组成, 已分别被应用于本氏烟、拟南芥和木薯的基因沉默研究 (Fofana *et al.*, 2004; Kjemtrup *et al.*, 1998; Turnage *et al.*, 2002)。与 RNA 病毒类 VIGS 载体相比, DNA 病毒类 VIGS 载体的优点是侵染性克隆构建简单, 无需转录, 稳定, 易于操作。但基因沉默效果似不如 RNA 病毒类 VIGS 载体。

继 RNA 病毒和 DNA 病毒为载体的 VIGS 体系建立后, 2002 年, Gossele 等对 TMV U2 的卫星病毒 (*Satellite tobacco mosaic virus*, STMV) 基因组进行改造, 使其具有插入外源片段的能力, 从而建立了一种基于卫星病毒的 VIGS 体系, 该 STMV 载体能够有效地抑制烟草上 *PDS* 等 13 个植物内源基因的表达并呈现明显的突变表型 (Gossele *et al.*, 2002)。2004 年, 浙江大学周雪平实验室在对中国番茄黄化曲叶病毒 (*Tomato yellow leaf curl China virus*, TYLCCNV) 的研究中, 分离和鉴定了一种新型的 DNA 卫星分子 (DNA β), 并对 DNA β 上的 β C1 基因进行了缺失和引入多克隆位点 (multiple cloning sites, MCS), 改造成为一种 DNA 卫星载体, 该载体可以有效地抑制转基因 *GFP* 的表达, 也可以高效地抑制内源基因 *PDS* 和 *Su* 的表达 (陶小荣等, 2004), 应用于多种茄科植物的 VIGS 分析 (Tao and Zhou, 2004; Cai *et al.*, 2007;

Xu *et al.*, accepted)。该载体的优点是卫星病毒基因组在植物中复制量大，本身基因组小，载体构建操作相对容易，对高温不敏感，非常适宜于维管束组织特异性表达基因的 VIGS 分析 (Cai *et al.*, 2007; Xu *et al.*, accepted)。

2.2.2 VIGS 的作用机制

VIGS 是一个由小分子 RNA 驱动的过程，其主要步骤包括作为小分子 RNA 前体的双链 RNA(double strand RNA, dsRNA)的形成，小分子 RNA 的形成，小分子 RNA 指导的 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA induced silencing complex, RISC) ——一种多亚基核酸酶的形成，小分子 RNA 与靶标 RNA 结合剪切降解 RNA 模板或通过其他机制抑制靶标 RNA 的翻译等。

其作用机制主要可以分为三步进行。

一、小分子RNA的前体dsRNA的形成。当含有目的基因的重组病毒载体侵染植株时，目的基因片段在RNA引导的RNA聚合酶 (RNA-directed RNA polymerase, RdRp) 作用下合成大量dsRNA。dsRNA是病毒复制过程中的一个中间体，是基因沉默的关键起始因子。DNA病毒没有RdRp，因此可能与转基因诱导的PTGS一样需要植物内源的RdRp参与合成dsRNA。但RNA病毒载体导入植物后，其自身携带的RdRp足以合成dsRNA (Dalmay *et al.*, 2000; Dalmay *et al.*, 2001)。

二、小分子 RNA 的形成。dsRNA 在 Dicer 催化作用下产生大小为 21-25nt 的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNAs)。siRNAs 是 RNA 基因沉默的代表性特征 (Hamilton *et al.*, 1999; Wassenegger, *et al.*, 1998)。Dicer 是 RNaseIII 家族的一个重要成员，包含 1 个解旋酶结构域，1 个 PAZ 结构域，1 个 dsRNA 结合结构域和 2 个 RNaseIII 结构域。小 RNA 可以分为两类：一类是 21-22nt 的单链小 RNA (micro-RNA, miRNA)，它是从内源的 hairpin RNA 前体降解而来的 (Hamilton and Baulcombe, 1999)，它调控转录因子、激素反应因子和沉默相关基因的转录和翻译 (Carrington and Ambros, 2003)；另一类是 3' 端有 2nt 突出的 21-26nt 的双链小干扰 RNA，它在系统性基因沉默及同源 DNA 的甲基化中起重要作用 (Hamilton *et al.*, 2002)。

三、小分子 RNA 指导的 RISC 的形成。siRNA 在生物体内与特定的蛋白结合形成 RISC，siRNA 双链解开，带有 siRNA 的 RISC 特异地识别细胞质中的目的基因的单链 mRNA，导致目的基因 mRNA 特异降解，从而导致目的基因在 mRNA 水平上的沉默 (Hammond *et al.*, 2000)。

2.2.3 VIGS 的优势

随着基因组计划的实施和进展,越来越多的未知基因功能有待进一步鉴定,在筛选植物功能基因上,传统上是通过 T-DNA 和转座子 (AzpirozLeehan and Feldmann,1997) 随机插入植物基因组获得突变体,从而从表型突变上来筛选相关功能基因。在拟南芥系之上,这是筛选基因、鉴定功能的一种有效方法,但是其周期长、工作量大、过程繁琐、完全依赖于转基因体系的成熟。与其相比, VIGS 具有成本低、速度快、高通量、重复性高等优点,只需将已知或未知基因片段插入病毒载体,采用农杆菌浸润等方法导入植物,2-3 周后就可以通过比较侵染叶片和非侵染叶片的表型来筛选功能基因,方便大规模地进行基因组序列、EST 序列的功能鉴定。对于一些与细胞基本功能或是发育早期相关的基因,其突变往往是致死突变,采用传统的方法无法得到突变体,而 VIGS 可以对成熟期的植物进行诱导并产生表型突变,从而对致死基因的功能进行研究。对多基因家族的基因功能研究,传统的插入突变通常只能导致一个多基因家族中一员的突变,其功能可以通过其它成员来弥补,可能不产生预期的表型,从而无法研究家族成员的功能,而 VIGS 可以解决这些问题,它可以使序列差异在 10%-20%之间的同源基因发生沉默,只要选取所有家族成员的高保守区,就能沉默整个家族成员,已报道利用 VIGS 可以使 *Rubisco* 小亚基基因家族发生沉默。

2.3 VIGS 在植物基因功能鉴定中的应用现状

1998 年以来, VIGS 被广泛地应用于植物基因功能的鉴定,主要用于发育、代谢、抗病相关基因的沉默分析。

2.3.1 利用 VIGS 研究发育和代谢基因

2000 年, Burton 等在烟草中以 PVX 为载体,利用 VIGS 技术对植物细胞壁纤维素合成酶基因 *CesA* 的功能进行研究。当带有 *CesA* cDNA 片段的 PVX 重组载体侵染本氏烟后,细胞壁丧失合成纤维素的能力,在植物叶片下表皮形成松散膨胀的非正常球形细胞,同时整个植株出现矮化现象 (Burton *et al.*, 2000)。Ratcliff 等 (2001) 使用 TRV 载体,沉默了烟草 *NFL* (*Nicotiana FLO/LEY*) 基因,沉默植株的次生、三生侧枝、花表型异常;萼片卷曲、花序变形、无雄蕊、无瓣 (Ratcliff *et al.*, 2001)。2003 年,英国 Baulcombe 研究小组用 TRV 载体抑制烟草近 5000 个不同 cDNA 的表达,15%的 cDNA 被抑制后植株出现生长异常特征,从而获得了这些片段的生物学

信息, 表明 VIGS 可以被应用于大规模的序列未知的植物基因功能的研究 (Lu *et al.*, 2003b)。Faiver-Rampant 等 (2004) 用 PVX-*PDS* 侵染马铃薯叶片, 经过 3 代 120 天后, 发现马铃薯块茎中的 *PDS* 基因的表达也受到显著抑制。可见, VIGS 也可用于植物繁殖器官基因功能的研究 (Faiver-Rampant *et al.*, 2004)。

在代谢途径方面的研究中, VIGS 也发挥着相当大的作用。通过 VIGS 发现光合系统 II 的放氧复合体 (oxygen-evolving complex) 被抑制后, TMV 复制增强, 表明该复合体在抗 TMV 侵染过程中起作用 (Abbink *et al.*, 2002)。通过 VIGS 对本氏烟中两个呼吸爆发氧化酶同源基因 (Respiratory burst oxidase homologs, *rboh*) *NbrbohA* 和 *NbrbohB* 进行沉默, 研究其活性氧调控过程, 发现这两个基因对于 H_2O_2 的积累以及对植物病原菌的抗性都起着重要作用 (Yoshioka *et al.*, 2003)。

2.3.2 利用 VIGS 研究植物抗病途径中信号基因

利用 VIGS 对植物抗病途径相关基因的研究和鉴定是目前开展最为广泛的领域。2000 年, Liu 等利用 VIGS 证明了 *RAR1* 在烟草抗 TMV 中起重要作用; 同年, Romeis 等分离得到两个 Ca^{2+} -依赖蛋白激酶 (calcium-dependent protein kinase, CDPK) cDNA *NiCDPK2* 和 *NiCDPK3*, 并利用 VIGS 对 *NiCDPK2* 在烟草中的功能进行验证, 发现 *NiCDPK2* 沉默植株表现过敏反应减弱并推迟产生, 不产生萎焉表型 (Romeis *et al.*, 2001)。烟草 *N* 基因介导的对 TMV 抗病反应是经典植物病原互作研究系统。Peart 等和 Liu 等利用 TRV 载体对该抗性反应中重要信号基因进行了研究, 发现 *EDS1*、*RAR1*、*SGT1*、与 *SGT1* 互作的 *SKP1* 以及关键调控因子 *NPR1*、*NPK1* 对 *N* 基因介导的抗性是必需的 (Liu *et al.*, 2002; Peart *et al.*, 2002); 分别编码促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) *NTF6/NPK1*、MAPK 激酶 (MAPKK) *MEK1* 与 *MEK2*、*WRKY1*-*WRKY3* 及 *MYB1* 转录因子, 茉莉酸信号途径因子 *COL1* 的基因的沉默或表达水平的下降, 均降低抗病性, 表明这些基因是 *N* 介导的抗病反应的正调控因子 (Liu *et al.*, 2004a; 2004b)。

另一基因对基因抗性系统—*Pto* 介导的抗病系统相关基因也通过 VIGS 得到鉴定研究。Baulcombe 研究小组发现热激蛋白 HSP90 对 *Pto* 介导的对丁香单胞杆菌 (*Pseudomonas syringae*) 的抗性是必需的 (Lu *et al.*, 2003a)。Ekengren 等发现, MAPKK 基因 *MEK1* 与 *MEK2*、MAPK 基因 *NTF6* 与 *WIPK*、*NPR1* 和转录因子 *TGA1a* 与 *TGA2.2*, 对于 *Pto* 介导的抗性也是必需的, *RAR1* 与 *COL1* 在该途径中也有微弱作用 (Ekengren *et al.*, 2003)。

最近, Scofield 等用 BSMV 介导的 VIGS 研究了 RAR1、SGT1 和 HSP90 在小麦抗叶锈菌中的功能, 证明 *RAR1*、*SGT1* 和 *HSP90* 基因在抗叶锈基因 *Lr21* 介导的抗性中是必需的 (Scofield *et al.*, 2005)。Hein 等也通过类似方法证明 *RAR1*、*SGT1* 和 *HSP90* 基因在大麦抗白粉病基因 *Mla13* 介导的抗病途径中非常重要 (Hein *et al.*, 2005)。

2.3.3 展望

迄今为止本氏烟是 VIGS 应用的主要模式植物, 但是随着 VIGS 载体的不断开发和发展, 将会在更多寄主植物上建立 VIGS 体系, 特别是在像豆科植物等用现有载体较难进行基因功能研究的植物上, 开发新的沉默载体, 使这些植物的功能基因研究可以得到开展。同时, VIGS 对植物功能基因组的应用范围也从较为熟悉的抗病信号途径扩展到代谢、发育等领域。相信随着 VIGS 适用物种的增多、技术的完善以及研究人员的增多, VIGS 将成为基因功能研究和植物功能基因组研究的普遍利用的有力工具。

3 基因沉默抑制子

3.1 引言

植物利用基因沉默对病毒产生抗性。作为一种应对植物防卫反应的策略, 病毒也能编码某种特异的蛋白质抑制寄主植物 PTGS, 这种蛋白质称为 PTGS 的抑制子 (Suppressor)。目前已在多种病毒中发现能编码抑制植物 PTGS 的蛋白质。PTGS 抑制子可能存在不同的作用方式, 有的抑制 PTGS 的启动(如 CMV 的 2b 蛋白), 有的则抑制 PTGS 的保持 (如 PVY 的 HC Pro 蛋白)。

3.2 基因沉默抑制子的发现和鉴定

在进行 CMV 2b 基因和其他 4 个 CMV 基因的比较中, 发现 CMV 2b 基因代表了 1 个新进化的基因, 这暗示着 CMV 2b 基因是病毒对植物抗病防御体系的适应。在 1995 年, Ding 等人就提出 CMV 2b 蛋白是寄主抗病体系的抑制因子。现有研究表明。有些病毒可以通过编码的蛋白来抑制基因沉默, 从而有利于病毒的侵染。目前已鉴定的主要抑制子已有 20 多个 (Bisaro, 2006), 最典型的包括: (1) 马铃薯 Y 病毒编码的 Hc-Pro(helper-component-proteinase); (2) 番茄丛矮病毒(*Tomato bushy stunt virus*, TBSV)编码的 p19 蛋白。该蛋白是目前研究最多的一类。TBSV 是一种正单链 RNA 病

毒，能够侵染20多个科120多种植物。它所编码的p19是一个多功能蛋白，不但决定了病害的发生程度，同时还与TBSV的细胞间运动、长距离扩散及系统感染时病症产生有关，后来发现p19还是一种RNA沉默抑制蛋白；（3）双生病毒ACMV (*African cassava mosaic virus*) 编码的AC2；（4）*Rice yellow mottle virus*编码的P1；（5）*PVX* 编码的P25；（6）*Beet western yellows virus*编码的P0等（Zamore, 2004; Voinnet *et al.*, 1999; 2000; Pfeffer *et al.*, 2002）。

最近, Reavy等人通过果蝇细胞来研究TRV沉默载体, 发现TRV-RNA1编码的16K蛋白可能是基因沉默的抑制子 (Reavy *et al.*, 2004)。但16K蛋白在抑制植物中产生的基因沉默中的作用有待进一步证实。

3.3 基因沉默抑制子的作用机理

病毒基因沉默抑制子的作用机理是最近研究热点。以上述经典病毒基因沉默抑制子为对象的研究发现，不同类型病毒基因沉默抑制子的作用机理不同，目前已知的至少有以下几类：

（1）病毒基因沉默抑制子与siRNA或合成siRNA必需的前体长dsRNA相结合，使游离siRNA无法达到足以启动形成RISC复合物的积累量，从而抑制基因沉默的产生。已知属于直接与siRNA结合的病毒基因沉默抑制子包括TBSV p19, *Peanut clump virus* (PCV) P15, *Beet yellows virus* (BYV) p21, *Tobacco etch virus* (TEV) HC-Pro, *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) gamma B等；而既可与与siRNA结合，又可与合成siRNA必需的前体长dsRNA结合的病毒基因沉默抑制子则包括 *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) P14, *Turnip crinkle virus* (TCV) CP等 (Lakatos *et al.*, 2006; Merai *et al.*, 2006; Omarov *et al.*, 2006)。

（2）病毒基因沉默抑制子与Argonaute 1 (AGO1)蛋白结合，抑制其募集siRNA以及切割靶标RNA的活性，从而抑制基因沉默的产生。CMV 2b抑制子属于该类 (Zhang *et al.*, 2006)。

（3）需要寄主因子的参与。研究发现，AC2抑制基因沉默的功能依赖于其核定位信号和活化结构域的存在，AC2处理活化30多个寄主转录本积累水平的提高，说明AC2对植物基因沉默的抑制需要寄主因子的参与 (Trinks *et al.*, 2005)。

4 本研究的目的和意义

植物病害有多种表现形式,遵守基因对基因假说(gene-for-gene hypothesis)的抗性是其中重要的一种,对其产生机制的理解为植物病害的防治提供理论指导,是当今分子植物病理学领域前沿研究热点之一。

本研究对象番茄和叶霉菌系统是研究植物和病原物互作的模型系统(Joosten *et al.*, 1999)。番茄*Cf-4*和*Cf-9*等*R*基因及互补叶霉菌*Avr*基因*Avr4*和*Avr9*均已被克隆,番茄*Cf-9*对*Avr9*的识别及其下游信号传导途径的研究已取得许多进展(王长春等, 2006)。但总体上说,目前对*R/Avr*,包括*Cf/Avr*基因产物识别及其下游信号传导途径的理解还非常肤浅,更多关键基因的克隆及其功能的分析结果将较大地增进基因对基因抗性产生机理的理解。导师蔡新忠实验室已克隆了182个*Cf/Avr*介导产生过敏反应时特异表达的cDNA-AFLP片段,但这些基因在*Cf/Avr*介导产生抗病性中的作用尚有待进一步鉴定。

目前已明确的*R/Avr*基因产物识别及其下游信号传导途径的关键基因甚少,这与缺乏简便有效和高通量的研究技术方法有关。长期以来,主要采用转基因植株法对相关基因在抗病性中的作用进行鉴定和验证,但该方法周期长,耗费大量物力和空间,成本高,很难同时对大批基因进行操作。而病毒介导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)技术(Burch-Smith *et al.*, 2004)是一种十分强大的、可以快速、高通量、大规模进行未知基因功能鉴定的新技术,它可以很好地克服上述缺点。该技术不需构建转基因植株,一般1-2个月内即可知道结果,非常适合植物抗病关键基因的快速高通量筛选鉴定。

本研究拟将VIGS这一新兴技术应用于基因对基因抗性关键基因鉴定,选择部分已克隆的*Cf/Avr*介导产生过敏反应时特异表达的cDNA-AFLP片段为研究对象,采用VIGS技术鉴定这些基因在*Cf/Avr*介导产生抗病性中的作用,筛选其中在*Cf/Avr*介导产生抗病性中起重要作用的基因。所获结果将进一步地揭示番茄叶霉病抗性产生机制,为番茄叶霉病防治新策略的提出提供理论依据。

另一方面,VIGS技术发展十分迅速,已有源于10种病毒的VIGS载体相继得到开发和应用。其中TRV载体目前应用最为广泛。为了提高TRV载体的VIGS效率以及拓宽适用植物寄主范围,该载体已得到多次改造,这些改造主要集中在TRV-RNA2, Liu等(2002)版本插入了双倍35S CaMV启动子以及C端插入一个核酶,

导致更有效的病毒 RNA 的产生。而 TRV-2b 版本则保留了 2b 基因序列。不同版本的 TRV 载体在适用植物范围及可沉默植物组织等方面有显著区别。最近, Reavy 等采用果蝇细胞 RNAi 系统研究了 TRV 沉默载体中 RNA1 编码的 16K 蛋白的功能, 发现该蛋白可能是基因沉默的抑制子 (Reavy *et al.*, 2004)。但该蛋白抑制 RNAi 效率很低, 而且在抑制植物产生基因沉默中的作用尚不明确。本研究拟构建缺失 16K ORF 的 pTRV1 Δ 16K 结构, 通过与野生型 pTRV1 的比较研究, 确定 16K 蛋白是否为植物基因沉默抑制子, 探索进一步提高 TRV 载体基因沉默效率的新途径。

第二章 6 个 cDNA-AFLP 差异表达片段相应基因 在番茄抗叶霉病中作用的基因沉默分析

由植物抗病基因 (resistance gene, *R*) 和互补的病原物无毒基因 (avirulence gene, *Avr*) 控制的符合基因对基因 (gene-for-gene) 假说 (Flor, 1971) 的抗病性是植物抗性的重要表现形式。番茄和叶霉菌系统是研究基因对基因抗性的模型系统 (王长春等, 2006)。番茄 *Cf-4* 和 *Cf-9* 等 *R* 基因及互补叶霉菌 *Avr* 基因 *Avr4* 和 *Avr9* 均已被克隆, 番茄 *Cf-9* 对 *Avr9* 的识别及其下游信号传导途径的研究已取得许多进展 (Rivas 和 Thomas, 2002; 王长春等, 2006)。研究发现硫氧还蛋白与 *Cf-9* 直接结合负调控其下游防卫反应 (Rivas *et al.*, 2004); 活性氧的产生和胞外碱化, 及离子通道的改变是 *Avr9/Cf-9* 互作早期反应 (Piedras *et al.*, 1998, Blatt *et al.*, 1999); *Rcr1* 和 *Rcr2* 在 *Cf-9* 决定的抗性产生中起重要作用 (Hammond-Kosack *et al.*, 1994); 某些蛋白激酶也可能参与 *Cf-9* 下游信号传导 (Romeis *et al.*, 1999; 2001)。总体上说, 目前对 *R/Avr*, 包括 *Cf/Avr* 基因产物识别及其下游信号传导途径的理解还非常肤浅, 更多关键基因的克隆及其功能的分析结果将较大地增进基因对基因抗性产生机理的理解。

病毒诱导的基因沉默 (virus-induced gene silencing, VIGS) 是近年来发展起来的功能基因组学研究新技术。与转座子、农杆菌 T-DNA 插入突变分析等现有其它技术相比, VIGS 具有操作简便, 能快速获取表型; 无需构建转基因植株; 可用于突变致死基因的功能研究; 可用于功能冗余基因的功能研究; 可用于快速的不同植物种类间比较基因组学的研究; 可用于同一种植物不同遗传背景下的基因功能研究等优点。VIGS 已应用于 *N*、*Cf*、*Bs4*、*Rx* 和 *Pto* 等许多 *R* 基因介导的抗性信号传导关键基因的功能鉴定研究 (Tao *et al.*, 2004)。近年来, 采用 VIGS 技术研究明确钙依赖性蛋白激酶基因 *NtCDPK2* (Romeis *et al.*, 2001); *SGT* (Peart *et al.*, 2002b); 硫氧还蛋白基因 *CITRX* (Rivas *et al.*, 2004); 丝/苏氨酸蛋白激酶基因 *LeACIK1* (Rowland *et al.*, 2005), 以及泛素 E3 连接酶基因 *NtCMPG1* 为 *Cf-9* 介导的 HR 和抗病性所必需 (Gonzalez-Lamothe *et al.*, 2006)。利用 VIGS 技术大量 *Cf/Avr* 介导产生过敏性反应 (Hypersensitive response, HR) 时特异表达的 cDNA-AFLP 片段相应基因在 *Cf/Avr* 介导的 HR 中的作用得到了鉴定。

本研究挑选了 6 个本实验室已克隆的 *Cf/Avr* 介导产生过敏性反应时特异表达的

cDNA-AFLP 片段 (ACE 片段), 采用 VIGS 技术鉴定这些片段相应基因在 *Cf4/Avr4* 介导产生抗病性中的作用, 筛选其中起重要作用的基因。研究发现, 差异片段 95 相应基因可能在 *Cf4/Avr4* 介导产生 HR 中起重要作用, 差异片段 14、85 和 111 相应基因则可能与植株的生长和发育相关。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*) 由本实验室繁育; 播于小培养钵置于人工智能植物培养箱中, 22°C, 16h/8 h 光/暗周期下培养。

1.1.2 菌种和质粒

大肠杆菌 DH5 α 、农杆菌 GV3101 由本实验室保存。Cf/Avr 介导产生过敏反应时特异表达的 cDNA-AFLP 差异表达片段由实验室克隆和保存。转化了 pRPH312.25::*Avr4*(含无毒基 *Avr4*)和 pCHF3::*Cf-4*(含有 R 基因 *Cf-4*)的农杆菌 GV3101 均由本实验室保存。TRV 基因沉默载体由美国耶鲁大学 Dinesh-Kumar SP 博士惠赠。

1.1.3 PCR 检验引物

根据 pTRV2 (pYL156) 的序列设计引物, 用于 PCR 扩增。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

表 2.1: 用于检验 pYL156 中插入片段的 PCR 中使用的引物
Table 2.1: Primes of PCR for identification of an insert in pYL156

引物编号	引物序列(5'→3')
CXZ80	AGATTCTGTGAGTAAGGTTACCG
CXZ81	CCGTAGTTAATGTCCTTCGGGAC

1.1.4 主要试剂及试剂盒

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq plus* 聚合酶等工具酶为 MBI Fermentas 公司产品; 琼脂糖、核酸分子量标准为 MBI Fermentas 和 Takara 公司产品; 凝胶回收

试剂盒购自 V-gene 公司, Biozol 购自博日公司。

1.2 方法

1.2.1 PCR 技术

1.2.1.1 常规 PCR 反应

1) 取一 0.5 mL PCR 薄壁管, 依次加入以下试剂:

10×反应缓冲液 (含 Mg^{2+})	5 μ L
dNTP 混合物, 10 mmol/L	1 μ L
上游引物, 10 μ mol/L	2 μ L
下游引物, 10 μ mol/L	2 μ L
模板 DNA	2 μ L
<i>Taq plus</i> DNA 聚合酶 (5U/ μ L)	0.5 μ L

加无菌双蒸水至终体积 50 μ L。

2) 反应参数设置:

94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min 后开始以下循环反应:

35 个循环	}	94 $^{\circ}$ C 变性 45 sec
		50 $^{\circ}$ C 退火 45 sec
		72 $^{\circ}$ C 延伸 60 sec

循环结束后 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 10 min;

3) 反应完毕, 取 5-10 μ L PCR 产物, 电泳检查扩增结果。

1.2.1.2 RT-PCR

cDNA 第一链合成:

1) 取一新的经 DEPC 处理的 0.5 mL 小离心管, 加入 RNA 溶液 (约 2 μ g, 体积视浓度而定), 加入 1 μ L 3'端引物 (oligo (dT)₁₆, 0.5 μ g/ μ L) 及 1 μ L 随机引物, 并加无 RNA 酶的水至终体积 20 μ L;

2) 70 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 迅速置冰上, 稍离心, 将溶液甩至管底;

3) 依次加入以下试剂:

5× 第一链合成缓冲液	10 μL
0.1 mol/L DTT	5 μL
20 mmol/L dNTP mix	3.5 μL
RNase 抑制剂(23 U/μL)	1 μL
MMLV 逆转录酶(20 u/μL)	2 μL
DEPC-H ₂ O	9.5 μl

总体积为 30 μL, 混匀后稍离心, 置 42℃温浴 60 min。

PCR 扩增:

采用两步法, 按照 1.2.1.1 体系加入各种试剂, 反应参数如下:

94℃预变性 2 min 后开始以下循环反应:

35 个循环	}	94℃变性 45 sec
		50℃退火 45 sec
		72℃延伸 60 sec

循环结束后 72℃继续延伸 10 min;

1.2.2 PCR 产物纯化

用 V-gene 割胶回收试剂盒回收目的 DNA 片段, 操作按产品说明进行。

1.2.3 DNA 克隆技术

1.2.3.1 酶切

取一 0.5 mL eppendorf 管, 依次加入以下试剂:

DNA	1 μg
限制性内切酶	0.5 μL
10×酶反应缓冲液	2 μL
加 ddH ₂ O	20 μL

混匀后短暂离心, 37℃酶切消化 1.5 h 后琼脂凝糖胶电泳检查结果。

1.2.3.2 连接

本研究通用的反应体系如下：

外源 DNA 片段	5 μ L (50-250ng)
线性化载体 DNA	1 μ L (50ng)
10 \times 连接缓冲液	1 μ L
T4 DNA 连接酶(3U/ μ L)	1 μ L
加 ddH ₂ O 至终体积为	10 μ L

混匀后短暂离心，置 4 $^{\circ}$ C 反应过夜。

1.2.4 转化

1.2.4.1 大肠杆菌热击转化

- 1) 取出-70 $^{\circ}$ C 保存的感受态细胞悬液，室温解冻；
- 2) 加入连接产物，轻轻混匀后，冰上放置 30 min；
- 3) 42 $^{\circ}$ C 水浴热激 90 sec，迅速置冰上冷却 5 min；
- 4) 加入 1 mL LB 液体培养基(不含抗生素)，37 $^{\circ}$ C 振荡培养 1 h，使转化细胞恢复正常生长，并表达抗性；
- 5) 将上述菌液离心一下，倒掉上部菌液，大约剩 100 μ L，涂布于含 50 μ g/mL Amp 的 LB 筛选平板，正面向上放 30 min，待菌液完全被培养基吸收后倒置培养皿，37 $^{\circ}$ C 培养至蓝白斑区分明显为止。

1.2.4.2 农杆菌电击转化

- 1) 取一管低温保存的感受态细胞，室温融化，置冰上，同时将电击杯放在冰上预冷；
- 2) 将连接产物与感受态细胞均匀混合，置于冰上 30~60 sec；
- 3) 将连接产物与感受态细胞的混合物加至预冷的电击杯内，轻击液体以确保连接产物与感受态细胞的悬液位于电击杯底部，将电击杯放进电击仪；
- 4) 在电击仪 GENE PULSER II Electroporation System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)上以电流 25 μ F，电阻无穷大，电压 2.5 kV，电击时间 5.0 msec

的条件电击感受态细胞进行电击转化:

5) 脉冲结束后, 尽可能快地取出电击杯, 加入 1 mL LB 培养液;

6) 将细胞转移至 1.5 mL 离心管中, 37°C 振荡培养 1 h;

7) 取 200 μ L 培养液涂布于蓝白筛选平板 (含 50 μ g/mL Amp), 37°C 培养至蓝白斑区分明显为止。

1.2.5 重组质粒的提取与鉴定

1.2.5.1 碱裂解法提取重组质粒

1) 取培养好的含质粒 DNA 的菌液 1.5 mL, 4°C 5000g 离心 10 min, 弃上清, 将离心管倒置使上清液全部流尽;

2) 用 100 μ L 溶液 I 充分悬浮菌体细胞;

3) 加入 200 μ L 新配制的溶液 II, 盖紧瓶盖, 缓缓地颠倒离心管数次, 以充分混匀内容物, 冰浴 10 min;

4) 加 150 μ L 预冷的溶液 III, 摇动离心管数次以混匀内容物, 冰上放置 15 min, 此时应形成白色絮状沉淀;

5) 4°C 下 10000 \times g 离心 10 min, 取上清液加入 5 μ L RNA 酶 (10 mg/mL) 37°C 水浴 20 min;

6) 加入等体积的饱和酚/氯仿(1:1), 振荡混匀, 4°C 下 12000 \times g 离心 10 min;

7) 取上层水相, 加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1), 振荡混匀, 4°C 下 12000 \times g 离心 10 min;

8) 取上层水相, 加 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠 (pH5.2) 和 2 倍体积的冰冷无水乙醇, -20°C 放 1 h;

9) 4°C 下 12000 \times g 离心 20 min, 去上清, 沉淀用冰冷的 70%乙醇洗涤, 4°C 12000 \times g 离心 5 min, 去上清;

10) 用小真空泵真空抽干沉淀, 溶于 50 μ L TE 或水中。

1.2.5.2 PCR 鉴定

取 1 μL 质粒溶液稀释 50 倍后作为反应模板，反应体系及扩增程序同 1.2.1.1。

1.2.5.3 酶切鉴定

同 1.2.3.1。

1.2.6 植物总 RNA 提取和电泳

1.2.6.1 器皿和容器的处理

所有待用的烧杯、研钵、试剂、离心管、量筒、枪头和试剂瓶等都用 0.1% DEPC 水溶液，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡 24 h。然后将能用高压灭菌的试剂、器皿、离心管、枪头等湿热高压灭菌 30 min，然后 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘干。玻璃和陶瓷制品 120 $^{\circ}\text{C}$ 干热烘 10h-12 h。

1.2.6.2 植物总 RNA 的提取

采用 Biozol 试剂一步法提取植物总 RNA，步骤如下：

- 1) 取 100 mg 左右新鲜烟草叶片，加液氮研磨成粉末；
- 2) 将粉末转入预冷的离心管中，加入 1 mL 左右的 Biozol 抽提液（按 100 mg 植物组织加 1 mL 左右的 Biozol 比例加入），摇匀，室温放置 5 min；
- 3) 按每毫升 Biozol 抽提液加入 0.2 mL 的比例加入氯仿，盖紧离心管盖，剧烈震荡 15 sec，室温放置 2 min；
- 4) 12000 rpm 离心 15 min，取上清于一新的离心管中，加入等体积异丙醇，颠倒混匀，室温放置 10 min；
- 5) 12000 rpm 离心 10 min，弃上清。用 1 mL 75%酒精清洗沉淀二次；
- 6) 4 $^{\circ}\text{C}$ ，5000 rpm 离心 5 min，弃去上清，室温干燥（注意不要过分干燥，否则会降低 RNA 溶解度）。然后将 RNA 溶于 DEPC 处理的 ddH₂O 中。必要时可在 55-60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴助溶，-70 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

1.3 实验方案

先构建用于沉默分析的结构，然后进行 VIGS 分析，通过 HR 检验，筛选获取番茄抗叶霉菌病相关基因。整个实验方案见图 2.1

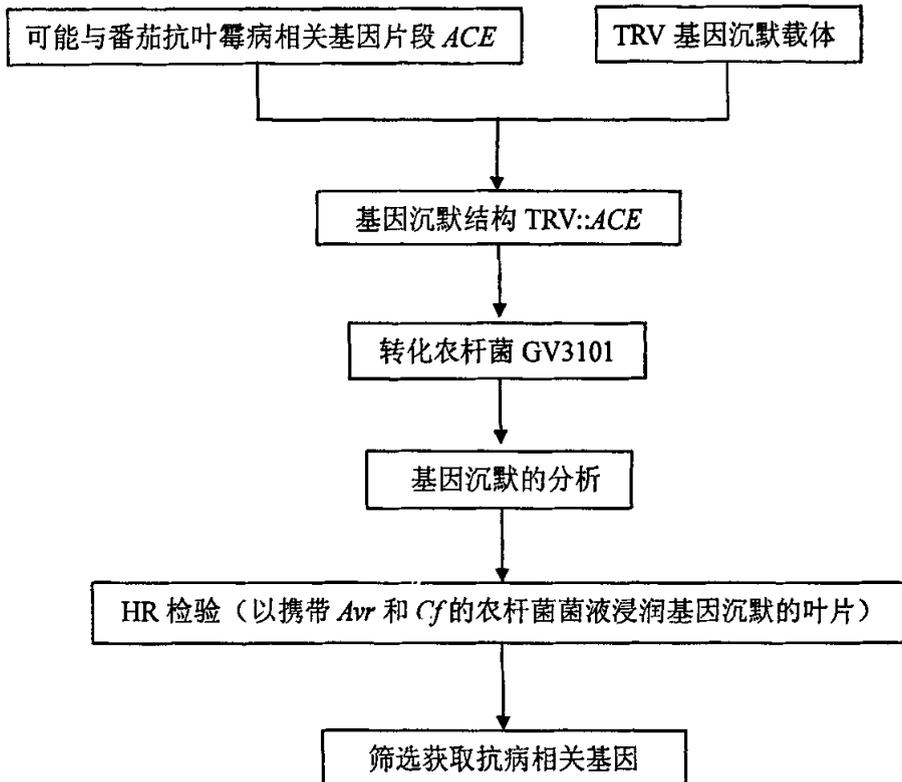


图 2.1 番茄抗叶霉病相关基因鉴定技术图

Fig.2.1 Identification of genes involved in resistance of tomato to *Cladesporium fulvum*

1.3.1 cDNA-AFLP 差异表达片段基因沉默结构的构建

挑选 6 个可能与番茄抗叶霉病相关的 AFLP 差异片段 (ACE 片段) 5、14、39、85、95 及 111 (GeneBank 序列号分别为 CK348288、CD579102、CD579123、CD579148、CD579154 及 CD348296), 将这些片段连接到 pUCm-T 载体 (已由本实验室博士构建), 以 *Bam*H I、*Eco*R I 酶切该质粒, 酶切产物亚克隆至经同样酶切的 pYL156 基因沉默载体, 获取重组质粒 pYL156::ACE, 经酶切、PCR 检验其正确性。pTRV1 和 pYL156::ACE 分别电激转化农杆菌 GV3101。

1.3.2 农杆菌接种液的准备

挑取新鲜培养的 pTRV1、pYL156 空载体、pYL156::ACE 农杆菌单菌落, 接种 3 mL 含 Kan (100 μ g/mL) 的 YEB, 28 $^{\circ}$ C 170 rpm 培养 16 h 至 OD₆₀₀ 为 1.2—1.6, 以适当比例接入 100 mL YEBi, 当菌液 OD₆₀₀ 为 0.8-1.2 时, 4000 rpm 离心 10 min 收集

菌体细胞,以适当体积的 MMAi 重悬至 OD_{600} 为 4.0,将 pYL156 空载体、pYL156::ACE 转化菌分别与 pTRV1 转化菌等体积混合,使各种菌终浓度为 $OD_{600}=2.0$, 25°C 50 rpm 恢复培养 2 h, 供接种用。

1.3.3 农杆菌接种

采用叶片针筒浸润法,先用注射器针头轻轻刺破叶背面造成微伤口,用去针头的注射器从背面伤口处注入菌液。

设 pYL156::ACE、空 pYL156 两个沉默处理,每个处理接种 20 株本氏烟,每株浸润 4-5 片真叶。接种后植株置于人工智能植物培养箱中, 25°C ,16h/8 h 光/暗周期下培养。

1.3.4 HR 检验

本氏烟经基因沉默处理 21 d 后,按照 1.3.2 所述方法获取 $OD_{600}=4.0$ 的分别转化了 pRPH312.25::Avr4 和 pCHF3::Cf-4 的农杆菌菌液,以 1:1 混合均匀, 25°C 恢复培养 2 h 后,以一次性无菌 1 mL 针筒浸润处理叶片。处理后植株置于人工智能植物培养箱中, 25°C ,16h/8 h 光/暗周期下培养。密切注意观察浸润叶片中过敏性坏死发生的迟缓、轻重。

1.3.5 VIGS 靶标基因转录本在植株体内积累量的检测

通过半定量 RT-PCR 方法检测植株体内 VIGS 靶标基因转录本的积累量。沉默诱导处理后 3 周,取经 pYL156::ACE 和空 pYL156 沉默诱导处理的植株中准备用于 HR 检验的叶片(浸润叶以上 3-4 叶),分别提取总 RNA,反转录成 cDNA,以这些 cDNA 为模板,以表 2.2 所列引物分别扩增 VIGS 靶标基因片段,每个反应重复 3 次。对照为烟草 *Actin* 基因。

表 2.2 用于扩增 VIGS 靶标基因片段的 PCR 引物
Table 2.2 The PCR primers used for amplification of the VIGS target gene fragments

目的基因	引物序列 (5'→3')	产物大小 (bp)
<i>Actin</i>	F: ACTGATGAAGATACTCACAGA	280
	R: TGGAATTGTATGTGGTTTCAT	
<i>ACE5</i>	F: TAACTTTGTATTATATCACAA	210
	R: TGAGAGCATAGAGAACAATGT	
<i>ACE14</i>	F: TGTACTTCCAAGTCCACCTGA	300
	R: ATCCAAACCAAATTGGCAAG	
<i>ACE39</i>	F: TGATTTTGGTGGAGAGTAGGA	202
	R: ACCTGAGAACTATTCGAATAC	
<i>ACE85</i>	F: GATGAGCATAACGAGCCTGGCA	312
	R: ACGTTTGTAAGTAGCAATGT	
<i>ACE95</i>	F: AGATCCGTCTCGCCTCGTAT	290
	R: CTGTTTCTCTGAATCTTCAGA	
<i>ACE111</i>	F: CATGTCTGATCAAATTGTCA	200
	R: GTGCCCATGTGTCTTTGAG	

2 结果与分析

2.1 pYL156::ACE 片段的亚克隆及鉴定

将 *ACE* 片段 5、14、39、85、95、111 通过 *EcoR* I / *Bam* H I 分别插入 TRV 基因沉默载体 pYL156, 提取重组 pYL156 质粒, 经 *EcoR* I / *Bam* H I 双酶切后, 分别得到大小约为 150、230、220、420、400、140bp 的产物 (图 2.2), 与预计大小基本吻合, 证明这些片段已成功连到 pYL156 载体上。



图 2.2 重组质粒的酶切电泳鉴定

泳道 1-6: pYL156::ACE (5、14、39、85、95、111) 的 *EcoRI*/*Bam*HI 酶切产物;
M: DL 2000 DNA marker

Fig.2.2 Identification of recombinant plasmid by enzyme digestion

Lanes 1-6: *EcoRI*/*Bam*HI-digested pYL156::ACE (5、14、39、85、95、111);
M: DL 2000 DNA marker

随后, 采用 PCR 进一步验证 TRV 基因沉默载体中插入片段的正确性。挑取 pYL156::ACE 转化农杆菌 GV3101 的单菌落, 提取质粒, 并以这些质粒作为模板, 用引物对 CXZ80/CXZ81 进行 PCR 扩增, 扩增产物大小与预计大小一致 (图 2.3), 证明这些菌落含有目的基因片段。



图 2.3 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析

泳道 1-6: pYL156::ACE (5、14、39、85、95、111); PCR 扩增产物;
CK: 阴性对照(不加 RTase); M: DL 2000 DNA marker

Fig. 2.3 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification products

Lanes 1-6: PCR products amplified from pYL156::ACE(5、14、39、85、95、111);
CK: Negative control (without RTase); M: DL 2000 DNA marker

2.2 pYL156::ACE 基因沉默处理对生长发育和 Cf-4/Avr4 介导的过敏性坏死反应的影响

本氏烟经叶片浸润法农杆菌接种处理后 21d, 6 个 ACE 基因沉默处理植株和对照植株中, ACE14、ACE85 和 ACE111 等 3 个基因沉默处理植株表现出与对照不同的生长状态, 其中 ACE14 沉默处理植株严重矮缩, 节间缩短、叶片呈心形或其它畸形(图 2.4 A)。ACE85 沉默处理植株有的完全停止发育, 新叶不能形成, 茎干不能伸长(图 2.4 C), 部分植株能形成新叶, 茎干也能伸长, 但植株略矮化、叶片畸形(图 2.4 D)。ACE111 沉默处理植株略矮化、叶片畸形(图 2.4 E, F)。而 ACE5、ACE39 和 ACE95 沉默处理植株与对照一样生长正常(图 2.4 B, 及未显示图片)。

为了鉴定这些 ACE 基因在 Cf-4/Avr4 介导的过敏性坏死反应中的作用, 用分别表达 Cf-4 和 Avr4 的农杆菌混合液(1:1)浸润植株叶片, 3 d 后, 未经沉默诱导处理的对照植株的浸润叶表现强烈的 HR 坏死(图 2.5 A, B), ACE5、ACE14、ACE39、ACE85 和 ACE111 沉默诱导处理植株的浸润叶与对照植株一样表现强烈的 HR 坏死(图 2.5 C-G), 但 ACE95 沉默诱导处理植株的浸润叶不表现明显的坏死(图 2.5 H), 说明该基因可能在番茄抗叶霉菌中起重要作用。

6 个 ACE 基因对本氏烟生长发育及 Cf-4/Avr4 介导的 HR 反应的影响见表 2.3

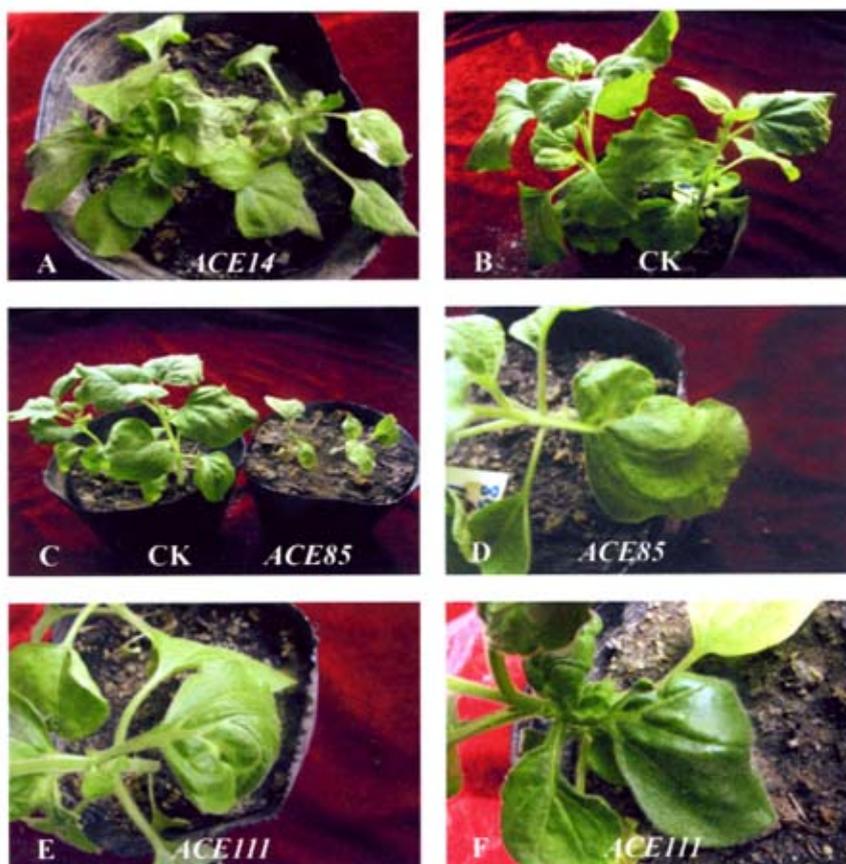


图 2.4 *ACE* 基因沉默处理对本氏烟生长发育的影响

沉默处理的基因: A:*ACE14*; B:空 pYL156 对照; C:空 pYL156(左); *ACE85*(右); D: *ACE85*; E-F: *ACE111*

照片摄于沉默诱导接种处理后 24d

Fig.2.4 Influence of *ACE* VIGS treatment on *Nicotiana benthamiana* development
ACE genes for VIGS : A: *ACE14*; B: empty pYL156 (CK); C: empty pYL156(left) ; *ACE85*(right); D:
ACE85; E-F: *ACE111*

The photographs were taken 24 days after VIGS induction inoculation



图 2.5 *ACE* 基因沉默处理对 *Cf-4/Avr4* 介导的 HR 反应的影响
 沉默靶基因: A, B: 空 pYL156 对照; C: *ACE5*; D: *ACE14*; E: *ACE39*; F: *ACE85*; G: *ACE111*; H:
ACE95

照片摄于浸润接种处理后 3d

Fig.2.5 Influence of pYL156:: *ACE* on HR

Genes for VIGS: A, B: empty pYL156 (CK); C: *ACE5*; D: *ACE14*; E: *ACE39*; F: *ACE85*; G:
ACE111; H: *ACE95*

The photographs were taken 3 days after agroinoculation

表 2.3 6 个 *ACE* 基因片段对本氏烟生长发育及 Cf-4/Avr4 介导 HR 反应的影响
 Table 2.3 The effect of six AFLP fragments on growth and development of *Nicotiana benthamiana* and Cf-4/Avr4-dependent HR

AFLP fragment	GeneBank accession number	Top homology (DFCI/NCBI)	对发育的影响	对 Cf 介导的 HR 的影响
5	CK348288	No similarity	-	-
14	CD579102	Protein Ser/Thr phosphatase	+	-
39	CD579123	Cytoplasmic 40S ribosomal protein S13	-	-
85	CD579148	LRR-containing protein kinase	+	-
95	CD579154	No similarity	-	+
111	CK348296	HSR203J protein-like	+	-

2.3 病毒诱导基因沉默的 RT-PCR 检测

以 pYL156::*ACE* (5、14、39、85、95、111) (对照为 pYL156 空载体为对照) 农杆菌接种植株 21d 后, 提取接种叶上方第 3 叶 (用于 HR 检验) RNA, 反转录成 cDNA, 以表 2.2 所列为引物分别扩增 *ACE* (5、14、39、85、95、111) 等 VIGS 靶标基因片段, 结果表明, 6 个 *ACE* 基因转录本在沉默处理植株叶片中的积累量均显著低于空载体处理的对照植株 (图 2.6), 说明这些基因在植株中得到了有效的沉默, 在 2.2 中描述的有关 HR 检验的结果是由于这些基因沉默导致的结果。

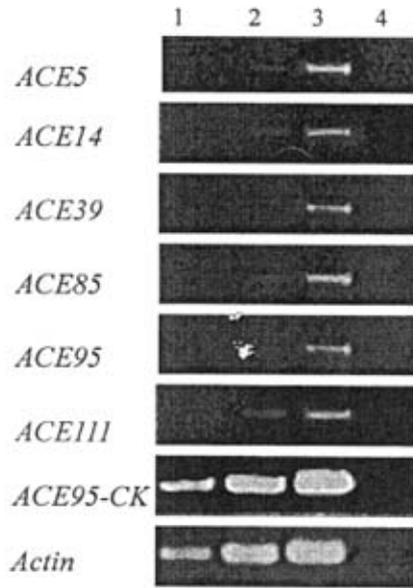


图 2.6 病毒诱导基因沉默的 RT-PCR 检测图

1-3: 20, 28, 35 个循环的 PCR 产物; 4: 阴性对照(不加 RTase)

Fig. 2.6 Confirmation of the gene silencing in leaves

1-3: products from PCR of cycles 20, 28, and 35, respectively;

4: Negative control (without RTase)

3 讨论

植物抗病性的产生常伴随基因转录水平的改变。有关采用 DD-PCR、cDNA-AFLP、SSH (Suppression subtractive hybridization)、cDNA/olige microarray 等方法在亚基因组、基因组水平检测分析伴随植物抗性产生的基因转录的改变方面的结果已有大量论文报告。然而, 有关海量的转录水平发生改变的基因在植物抗病性中的具体作用的分析报告相对甚少, 是当前有关抗病机理研究的瓶颈, 是植物病理学工作者面临的挑战。近几年, 研究基因功能新技术——病毒诱导的基因沉默 (VIGS) 的发展给解决上述问题提供了一个快速有效的技术平台, 该技术在番茄抗叶霉菌基因的筛选中的应用是利用该技术筛选抗病基因的成功范例。英国 Jones 研究组和荷兰 DeWit 和 Joosten 研究组采用 cDNA-AFLP 技术分别克隆了 260 和 405 个分别在 *Cf9/Avr9* 和 *Cf4/Avr4* 介导的 HR 产生与否差异表达的基因片段 (Durrent *et al.*, 2000; Gabriels *et al.*, 2006)。随后采用 VIGS 技术鉴定了其中 43 和 192 个片段相应基因在 *Cf/Avr* 介导的 HR 和抗病性中的作用, 并分别发现 *Cf9/Avr9* 介导的抗病关键基因 ACIK1 (Rowland *et al.*, 2005), CMPG1 (Gonzalez-Lamothe *et al.*, 2006); 以及

NRC1 等 15 个 *Cf4/Avr4* 介导的抗病性相关基因 (Gabriels *et al.*, 2006)。我们在 2003 年成功克隆了 182 个 *Cf9/Avr9* 和 *Cf4/Avr4* 介导 HR 产生与否差异表达的 cDNA-AFLP 片段, 称为 ACE (*Cf/Avr elicited*) 片段 (Hong *et al.*, *acceptd*)。随后开展了利用 VIGS 的技术鉴定这些 ACE 基因在番茄抗叶霉病中的作用研究。本研究为该工作的部分工作。研究利用 VIGS 鉴定了 6 个 ACE 基因在 *Cf4/Avr4* 介导的 HR 中的作用。发现 ACE95 的沉默导致 *Cf4/Avr4* 介导的 HR 的散失, 说明该基因可能在 *Cf4/Avr4* 介导的 HR 和抗病性中起重要作用。我们的研究证明结合 cDNA-AFLP 和 VIGS 技术筛选植物抗病相关基因的有效性。

利用 VIGS 技术鉴定基因在植物看病性中作用的同时还可明确这些基因在植物生长发育中的作用。本研究发现 ACE 片段 14、85 和 111 相应基因沉默植株表现矮化、畸形等表型, 说明这些基因可能与植物生长发育相关。另外, 经 ACE85 转化菌处理的植株出现了两种情况: 一种植株能伸长, 但叶片畸形; 另一种植株生长和发育受抑严重, 植株矮化, 有的甚至死亡。这可能是因为沉默效果不一样引起的, 前者沉默效果不如后者, 导致生长和发育受抑制的程度没有后者严重。

下一步, 我们将通过 SMART RACE 扩增技术获取这些与生长发育或是抗病相关片段的 cDNA 全长序列, 克隆这些基因, 对它们进行功能的研究。

第三章 pTRV1 中 16K ORF 对 TRV 介导基因沉默的影响分析

病毒诱导的基因沉默 (Virus induced gene silencing, VIGS) 是近年发展起来的一项新技术, 它是指将目的基因片段插入到病毒基因组中, 当含有该片段的病毒侵染寄主植物并在体内系统扩散后, 通过双链 RNA 降解机制降解与插入病毒基因组内的片段同源的植物内源基因 mRNA, 导致目的蛋白无法被翻译 (Baulcombe, 1999)。目前已经相继开发了多种可在拟南芥, 本氏烟, 番茄, 马铃薯, 木薯, 大豆和大麦等植物上进行沉默的病毒载体 (Robertson, 2004), 这些载体大多应用于茄科植物, 特别是本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*) (Burch-Smith *et al.*, 2004)。其中, 由烟草脆裂病毒 (*Tobacco rattle virus*, TRV) 改造而来的载体是目前沉默效果较好、被应用最广泛的 VIGS 载体。

VIGS 是植物重要的抗病毒机制, 作为一种应对植物防卫反应的策略, 病毒也能编码某种特异的蛋白质抑制寄主植物产生针对病毒的基因沉默。这种蛋白质称为基因沉默抑制子 (Suppressor)。目前已在多种病毒中发现能编码抑制植物基因沉默的蛋白质。已鉴定的主要抑制子已有 20 多个 (Bisaro, 2006)。

pTRV1 中 16K 基因在病毒增殖和基因沉默中的可能作用已有一些研究。Liu 等 (2002) 发现该 16K 基因的突变体大大减少病毒 RNA 的积累, 用 TRV 或 PVX 载体超量表达 16K 基因显著加重症状, 证明 16K 基因在病毒增殖和致病性中起重要作用。另外, 以 CMV 2b 和 BSMV γ b 基因置换 16K 基因所得重组 TRV 病毒产生严重症状, 推测 TRV 16K 蛋白也可能为 RNA 沉默抑制子 (Liu *et al.*, 2002)。最近, Reavy 等人通过以果蝇细胞为材料的研究发现, TRV-RNA1 编码的 16K 基因与 *lacZ* 基因特异性 dsRNA 同时表达, 降低了该 dsRNA 诱导的 RNAi 效率, 但这种抑制作用的效率很低 (Reavy *et al.*, 2004)。另外, 16K 蛋白对植物产生基因沉默的影响有待进一步证实。

本研究拟构建缺失 16K ORF 的 pTRV1 结构, 对缺失型 TRV 与野生型 TRV 诱导基因沉默效果进行比较分析, 以明确 pTRV1 的 16K ORF 在 TRV 诱导基因沉默中的作用。此外, 利用缺失型 TRV 结构研究明确 16K ORF 在病毒增殖中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*)、三生烟 (*N. tabacum* cv. *Samsun*) 由本实验室繁育; 播于小培养钵置于人工智能植物培养箱中, 22℃, 16h/8 h光/暗周期下培养。

1.1.2 菌种和质粒

大肠杆菌DH5 α 、农杆菌GV3101由本实验室保存。转化了pYL156::PDS的农杆菌GV3101均由本实验室保存。TRV基因沉默载体 (pTRV1、pYL156) 由美国耶鲁大学Dinesh-Kumar SP博士惠赠, 克隆载体pUCm-T购自Sangon公司。

1.1.3 PCR 扩增引物

根据pTRV1序列, 设计合成引物, 用于PCR扩增。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

表 3.1 本研究涉及的引物
Table 3.1 Primes used in this study

引物编号	引物序列(5'→3')
TRV1-MP3'-F1	GGTGTACAACCTAGTTGTAACA
TRV1-MP3'-R2	CGAGGCCTATTGACAATAAATTTCTTTATGC
NbPDS-F	TCATCGTTTCGTACTTCCTCA
NbPDS-R	CCTATCAGGCACACCTTGCT
CXZ80	AGATTCTGTGAGTAAGGTTACCG
NostR1	GATCTAGATACATAGATGAC
Actin-F	ACTGATGAAGATACTCACAGA
Actin-R	TGGAATTGTATGTGGTTTCAT

1.1.4 主要试剂及试剂盒

限制性内切酶 *Spe* I 和 *Sfu* I、T4 DNA 连接酶、*Taq plus* 聚合酶等工具酶为 MBI Fermentas 公司产品; 琼脂糖、核酸分子量标准为 MBI Fermentas 和 Takara 公司产品;

凝胶回收试剂盒购自 Takara 公司, Biczol 购自博日公司。

1.2 方法

1.2.1 PCR 技术

1.2.1.1 梯度 PCR

1) 取一0.5 mL PCR薄壁管, 依次加入以下试剂:

10×反应缓冲液 (含Mg ²⁺)	5 μL
dNTP混合物, 10 mmol/L	1 μL
TRV1-MP ₃ '-F1, 10 μmol/L	2 μL
TRV1-MP ₃ '-R2, 10 μmol/L	2 μL
模板DNA	2 μL
<i>Taq plus</i> DNA聚合酶 (5 U/μL)	0.5μL

加灭菌双蒸水至终体积为50μL。

2) 反应参数设置:

94°C预变性 2 min 后开始以下循环反应:

35 个循环	{	94°C变性 45 sec
		48°C—58°C (每个循环上升 0.3°C) 退火 45 sec
		72°C延伸60 sec

然后 72°C继续延伸 10 min;

1.2.1.2 RT-PCR (见第二章)

1.2.2 DNA 克隆技术 (见第二章)

1.2.3 转化 (见第二章)

1.2.4 重组质粒的提取与鉴定 (见第二章)

1.2.5 植物总 RNA 提取和电泳 (见第二章)

1.3 实验方案

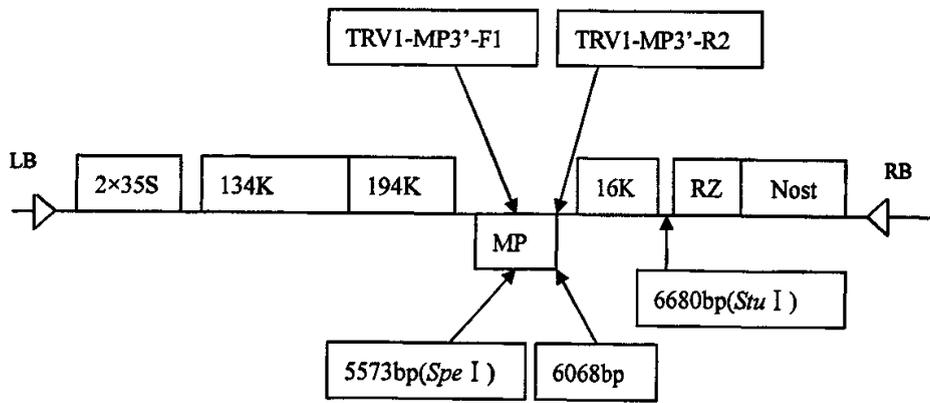
1.3.1 缺失 16K ORF 的 pTRV1 结构的构建

1.3.1.1 pTRV1 的结构

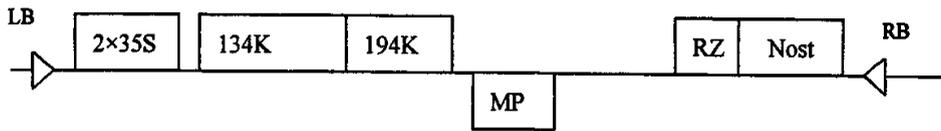
pTRV1的T-DNA区(图3.1 a)编码产物主要包含三类蛋白, 134K和194K复制酶蛋白、16K蛋白和29K移动蛋白(MP), 其中, MP与病毒的移动有关, 而16K被怀疑是沉默抑制子。MP位于pTRV1全序列(AF406990)的第5328bp-6086bp, 在MP中间即5573bp上有且只有一个*Spe I*酶切位点, 16K ORF在MP和核酶之间, 位于pTRV1全序列的第6111bp-6536bp, 在16K ORF后, 核酶前, 全序列第6680bp有且只有一个*Stu I*酶切位点。

1.3.1.2 pTRV1 Δ 16K 的构建

缺失16K ORF的pTRV1结构构建策略见图3.2。用*Spe I*/*Stu I*将pTRV1双酶切, 使pTRV1缺失MP的3'端(1/2MP)和16K ORF(pTRV1 Δ 1/2MP Δ 16K); 然后, 根据缺失的1/2MP序列设计引物对TRV1-MP3'-F1(添加*Spe I*酶切位点)/TRV1-MP3'-R2(添加*Stu I*酶切位点), 通过PCR扩增获得1/2MP, 大小为513bp, 割胶回收后, 连接至pUCm-T载体; 将该重组质粒pUCm-T::1/2MP进行*Spe I*/*Stu I*双酶切, 再与pTRV1 Δ 1/2MP Δ 16K连接, 获得缺失了16K ORF的TRV1结构pTRV1 Δ 16K(图3.1 b)。

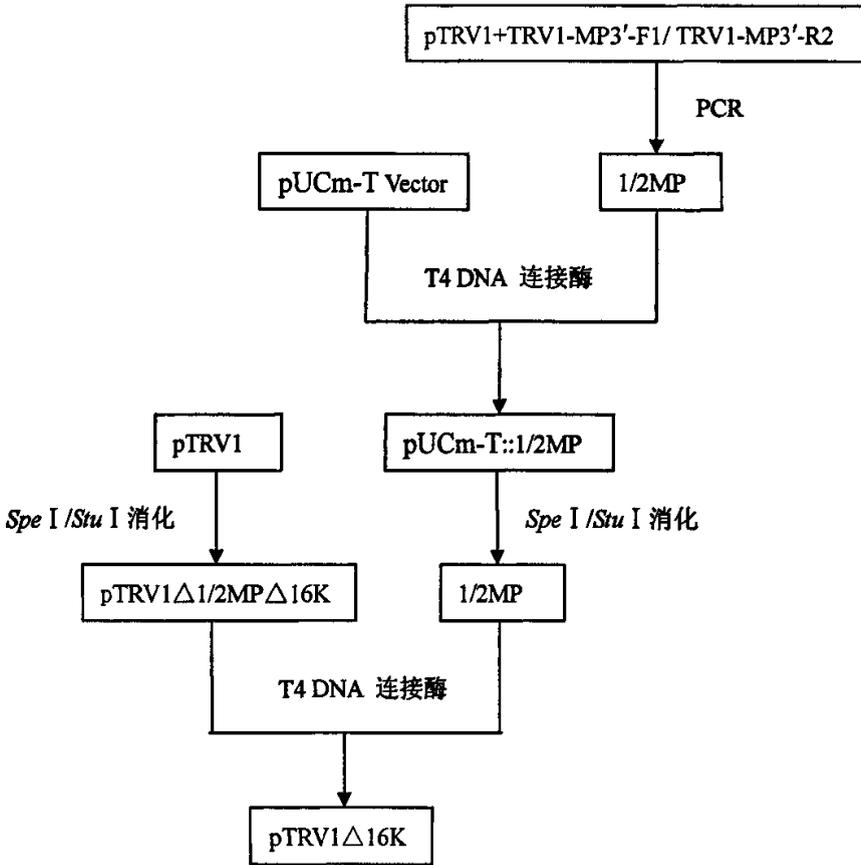


(a)



(b)

图3.1 pTRV1 (a) 和pTRV1 Δ 16K (b) 结构
Fig.3.1 Structure of pTRV1 (a) and pTRV1 Δ 16K (b)

图 3.2 pTRV1 Δ 16K 的构建策略Fig. 3.2 Schematic representation of the construction strategy of pTRV1 Δ 16K

1.3.2 农杆菌接种液的准备

挑取新鲜培养的pTRV1、pTRV1 Δ 16K、pYL156:: *NbPDS*的农杆菌单菌落，接种3 mL 含Kan (100 μ g/mL) 的YEB，28 $^{\circ}$ C 170 rpm培养16 h至OD₆₀₀为1.2~1.6。以适当比例接入100 mL YEBi，当菌液OD₆₀₀为0.8~1.2时，4000 rpm 离心10 min收集菌体细胞，以适当体积的MMAi重悬至OD₆₀₀为4.0，将pYL156:: *NbPDS*转化菌分别与pTRV1、pTRV1 Δ 16K转化菌等体积混合，使各种菌终浓度为OD₆₀₀=2.0，25 $^{\circ}$ C 50 rpm 恢复培养2 h，供接种用。

1.3.3 农杆菌接种

采用茎部注射、叶片针筒浸润、抽真空浸润三种方法。

茎部注射：用注射器直接将菌液注射入烟草茎秆的基部；

叶片针筒浸润：是先用注射器针头轻轻刺破叶背面造成微伤口，用去针头的注射器从背面伤口处注入菌液；

抽真空浸润：将植株倒置于农杆菌菌液中，一起放入抽真空容器中，真空泵抽至压强为 0.06 千帕，保持 5 秒，然后放气。

将 pYL156:: *NbPDS* 转化菌菌液分别与野生型 pTRV1 和缺失型 pTRV1 Δ 16K 转化菌菌液按 1:1 混合，分别按上述方法接种 5 叶期本氏烟植株。每种混合每种方法接种 10-20 株本氏烟，每株浸润第 4-5 片真叶。接种后植株置于人工智能植物培养箱中，25℃，16h/8 h 光/暗周期下培养。

1.3.4 VIGS 靶标基因转录本在植株体内积累量的检测

通过半定量 RT-PCR 方法检测植株体内 VIGS 靶标基因转录本的积累量。取经 pTRV1+pYL156::*NbPDS* 和 pTRV1 Δ 16K+pYL156::*NbPDS* 转化菌沉默诱导处理的植株中完全沉默的叶片，分别提取总 RNA，反转录成 cDNA，以这些 cDNA 为模板，以表 3.1 所列引物分别扩增 VIGS 靶标基因 *PDS* 片段，每个反应重复 3 次。对照为烟草 *Actin* 基因。

1.3.5 植株体内 TRV 病毒积累量的检测

采用半定量 RT-PCR 方法检测植株体内 TRV 病毒积累量。

取经 pTRV1+pYL156 和 pTRV1 Δ 16K+pYL156 转化菌沉默处理本氏烟 3d、7d 的接种叶和非接种叶子，分别提取总 RNA，反转录成 cDNA，以这些 cDNA 为模板，以 CZX80 和 NostR1 为引物扩增 pTRV2 的部分基因，长为 840bp 的片段。

2 结果与分析

2.1 pTRV1 MP 3'端 (1/2MP) 的克隆

以 pTRV1 为模板，采用引物对 TRV1-MP3'-F1/ TRV1-MP3'-R2，通过 PCR 扩增获得产物在泳道中只有单一条带，大小约 510bp (图 3.3)，与预计的目的片段大小一致。PCR 扩增产物经回收、连接、转化克隆到 pUCm-T 载体上，经蓝白斑筛选，挑取一白色单菌落，用碱裂解法小量提取质粒，进行 *Spe* I /*Stu* I 双酶切，产物条带大

小约 510bp (图 3.4), 表明该质粒是含有插入目的片段的重组子。



图 3.3 TRV1 1/2MP 片段 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析
泳道 1: PCR 扩增产物; M: DL 2000 DNA Marker
Fig. 3.3 Agarose gel electrophoresis of PCR product of TRV1 1/2MP
Lane 1: PCR product; M: DL 2000 DNA Marker

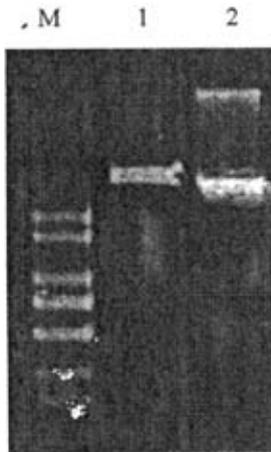


图 3.4 pUCm-T::1/2MP 重组质粒的酶切电泳鉴定
泳道 1: pUCm-T::1/2MP; 泳道 2: *Spe I/Stu I* 酶切后的 pUCm-T::1/2MP;
M: DGL 2000 DNA Marker
Fig.3.4 Identification of recombinant plasmid pUCm-T::1/2MP by enzyme
digestion
Lane1: pUCm-T::1/2MP; Lane 2: *Spe I/Stu I* -digested pUCm-T::1/2MP;
M: DGL2000 DNA Marker

2.2 序列测定与分析

通过克隆测序, 获得pTRV1中MP 3'端 (1/2MP) 序列。应用生物学分析软件DNAMAN, 对1/2MP序列与GenBank 中的pTRV1 (AF406990) 序列进行比较分析, 发现两者核苷酸序列完全相同, 说明该序列是我们所要保留的。

2.3 pTRV1 Δ 16K 的构建

pTRV1 质粒经 *Spe* I/*Stu* I 双酶切后, 有一条 1100bp 大小的条带 (图 3.5 箭头所示), 回收>10kb 的大片段。同样酶切处理 pUCm-T::1/2MP 质粒, 回收大小约 513bp 的 1/2MP 目的条带, 连接回收载体和 1/2MP 片段、转化后提取质粒, 并进行酶切和 PCR 鉴定。从图 3.6 中可以看出, 所挑选的两个菌落, 其中一个 (菌落 1) 是含有插入目的片段 1/2MP 的重组子。

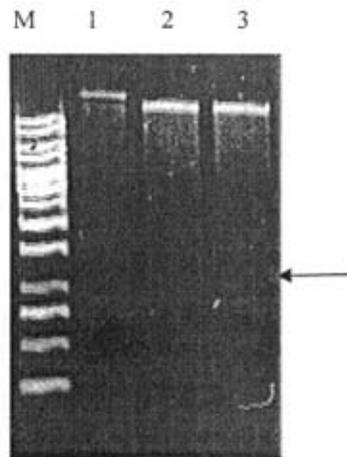


图 3.5 质粒 pTRV1 的酶切电泳图

泳道 1: pTRV1; 泳道 2, 3: *Spe* I/*Stu* I 酶切后的 pTRV1; M: Gene Ruler 1kb DNA Ladder

Fig.3.5 Plasmid pTRV1 digested by enzymes

Lane 1: pTRV1; Lane2, 3: *Spe* I/*Stu* I-digested pTRV1; M: Gene Ruler 1kb DNA Ladder

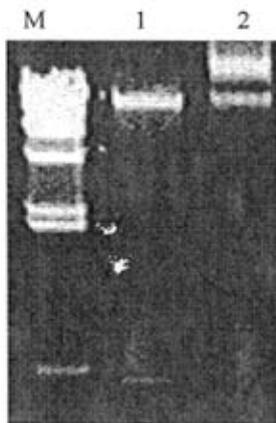


图 3.6 重组质粒 pTRV1 Δ 16K 的酶切电泳鉴定图

泳道 1: *Spe I/Stu I* 酶切后的 pTRV1 Δ 16K; 泳道 2: pTRV1 Δ 16K; M: λ DNA/*EcoR I+Hind III* marker

Fig.3.6 Identification of recombinant plasmid pTRV1 Δ 16K by enzyme digestion

Lane1: *Spe I/ Stu I* -digested pTRV1 Δ 16K; Lane 2: pTRV1 Δ 16K; M: λ DNA/*EcoR I+Hind III* marker

将重组质粒 pTRV1 Δ 16K 转化农杆菌 GV3101, 为进一步验证所获菌落确含重组质粒 pTRV1 Δ 16K, 采用碱法提取质粒, 以所获质粒为模板, 分别以 TRV1-MP3'-F1/TRV1-MP3'-R2、TRV1-MP3'-F1/ Nost-R1 为引物对进行 PCR 扩增, 分别获得大小约为 513bp 和 1100bp 的条带 (图 3.7), 与预计目的条带大小吻合。这些菌将用于基因沉默分析。

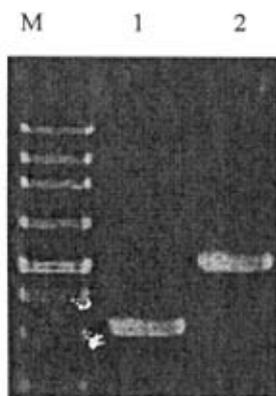


图 3.7 pTRV1 Δ 16K 质粒 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳分析

泳道 1: 以 TRV1-MP3'-F1/ TRV1-MP3'-R2 为引物的 PCR 扩增产物; 泳道 2: 以 TRV1-MP3'-F1/Nost-R1 为引物的 PCR 扩增产物; M:250bp DNA Ladder marker

Fig. 3.7 Agarose gel electrophoresis of PCR Prouducts amplified from pTRV1 Δ 16K

Lane 1: PCR product amplified using primers TRV1-MP3'-F1/ TRV1-MP3'-R2;

Lane 2: PCR prodict amplified using primers TRV1-MP3'-F1/ Nost-R1;

M: 250bp DNA Ladder marker

2.4 16K ORF 缺失型 TRV 与野生型 TRV 介导基因沉默效果比较分析

将缺失型 pTRV1 转化菌、野生型 pTRV1 转化菌分别与 pYL156::NbPDS 转化菌混合后, 接种植株, 对本氏烟采用叶片浸润法, 对三生烟分别采用茎部注射和抽真空浸润法。

结果(表 3.4)表明, 对本氏烟, 16K ORF 缺失型 TRV 转化菌接种的植株, 8d 后叶片开始泛白, 12d 叶片白化现象明显, 20 株植株全部沉默, 其中 18 株植株叶片沉默程度完全(图 3.8 A), 2 株植株叶片未完全白化, 边缘泛绿(图 3.8 C); 野生型 TRV 转化菌接种的植株, 9d 后叶片开始泛白, 12d 叶片白化现象明显, 20 株植株中有 19 株沉默, 其中 16 株植株叶片沉默程度完全(图 3.8 B), 3 株植株叶片中间和边缘泛绿(图 3.8 D)。

对三生烟, 我们采用了不同的接种方法, 所获的基因沉默效率均很低, 而且均为不完全沉默(图 3.9)。对于茎干注射接种方法而言, 缺失型 TRV 转化菌接种的 12 株植株, 23d 后, 12 株当中仅有 3 株植株叶片出现不均匀白化(如图 3.9 A); 野生型 TRV 转化菌接种的 20 株植株, 23d 后, 仅 2 株植株叶片出现不完全白化(如图 3.9 B); 抽真空浸润法接种的植株, 缺失型 TRV 转化菌接种的 19 株植株, 23d 后, 4 株心叶出现白化, 野生型 TRV 转化菌接种的 18 株植株, 仅 2 株心叶出现白化。无论用哪种接种方法, 缺失型和野生型 TRV 诱导产生的基因沉默均不持久, 在表现白化表型约 5-6 周后新生叶不再表现白化表型(如图 3.9 C)。另外, 多数表现不完全白化的植株叶片伴随病毒坏死斑的出现(如图 3.9 A, B), 还有些植株只表现严重的病毒坏死症状, 并不表现基因沉默后的白化症状(如图 3.9 D)。

表 3.4 16K ORF 缺失型 TRV 与野生型 TRV 载体诱导 PDS 基因沉默效果比较
Table 3.4 Efficiency of PDS gene silencing induced by the 16K ORF deletion mutant and the wild type TRV vectors

植 物	TRV	接种方法	沉 默 株 数/ 总 株 数 (%)	完 全 沉 默 株 数/沉 默 总 株 数 (%)	不 完 全 沉 默 株 数/沉 默 总 株 数 (%)
本氏烟	缺失型 TRV	叶片浸润	20/20 (100%)	18/20 (90%)	2/20 (10%)
本氏烟	野生型 TRV	叶片浸润	19/20 (95%)	16/19 (84%)	3/19 (16%)
三生烟	缺失型 TRV	茎干注射	3/12 (25%)	0/3 (0%)	3/3 (100%)
三生烟	野生型 TRV	茎干注射	2/11 (18%)	0/2 (0%)	2/2 (100%)
三生烟	缺失型 TRV	抽真空浸润	4/19 (21%)	0/4 (0%)	4/4 (100%)
三生烟	野生型 TRV	抽真空浸润	2/14 (14%)	0/2 (0%)	2/2 (100%)



图 3.8 16K ORF 缺失型 TRV 和野生型 TRV 诱导本氏烟 *PDS* 基因沉默症状

A: 缺失型 TRV 诱导的完全沉默; B: 野生型 TRV 诱导的完全沉默;

C: 缺失型 TRV 诱导的不完全沉默; D: 野生型 TRV 诱导的不完全沉默

照片摄于诱导沉默后 22d

Fig.3.8 *PDS* gene silencing in *N. benthamiana* induced by the 16KORF deletion mutant TRV and the wild type TRV

A: complete silencing induced by the deletion vector; B: complete silencing induced by the wild type vector;

C: incomplete silencing induced by the deletion vector; D: incomplete silencing induced by the wild type TRV1

The photographs were taken 22days post agroinfiltration



图 3.9 16K ORF 缺失型 TRV 和野生型 TRV 诱导三生烟 *PDS* 基因沉默症状

A: 缺失型 TRV 诱导沉默不完全; B: 野生型 TRV 诱导沉默不完全; C: 沉默恢复; D: 病毒症状

照片摄于诱导接种后 23d (A, B, C) 和 66d (C)

Fig.3.9 *PDS* gene silencing in *Nicotiana glauca* cv. *Samsun* induced by the deletion TRV and the wild type TRV

A: incomplete silencing induced by the deletion vector; B: incomplete silencing induced by the wild type TRV1;

C: recovery from silencing; D: virus symptom

The photographs were taken 23days (A, B, C) and 66 days (C) post agroinfiltration

2.5 VIGS 靶标基因 *PDS* 转录本在植株体内积累量的检测

为了在分子水平证实 *PDS* 基因沉默，选取 pTRV1 Δ 16K + pYL156::*NbPDS* 和 pTRV1 + pYL156::*NbPDS* 转化菌接种本氏烟植株中完全白化叶片，以未经沉默处理的植株叶片为对照，分别提取 RNA，反转录成 cDNA，以引物对 *NbPDS*-F/*NbPDS*-R 扩增 *PDS* 基因、以引物对 *Actin*-F/*Actin*-R 扩增 *Actin*（内标基因）片段。结果表明，白化叶片的 *PDS* 转录本积累量明显低于未经过沉默诱导处理的绿色叶片，仅见很微弱条带。经缺失型 TRV 接种的白化叶片中 *PDS* 转录本积累量略低于野生型 TRV 接种的白化叶片（图 3.10）。

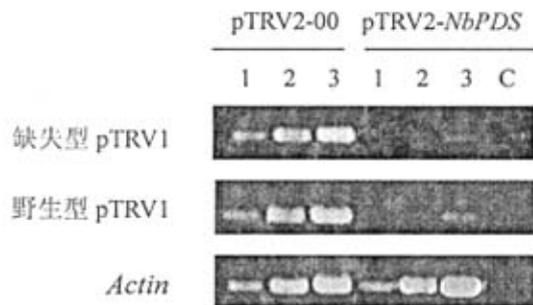


图 3.10 本氏烟植株体内 *PDS* 转录本积累量的 RT-PCR 分析
泳道 1-3: 20, 28, 35 个循环的 PCR 产物; C: 阴性对照 (不加 RTase);
pTRV2-00: 空 pTRV2

Fig. 3.10 RT-PCR analysis for *PDS* transcript accumulation in *N. benthamiana* plants
Lanes 1-3: Products of PCR of 20, 28, and 35 cycles; C: Negative control
(without RTase); pTRV2-00: empty pTRV2

2.6 本氏烟植株体内 TRV 病毒积累量的检测

分别选取 pTRV1 Δ 16K 和 pYL156 转化菌混合液以及 pTRV1 和 pYL156 转化菌混合液沉默处理后 3d 和 7d 后的本氏烟接种叶和植株新长成的非接种叶，分别提取总 RNA，反转录成 cDNA，以这些 cDNA 为模板，以 CZX80 和 NostR1 为引物扩增长度为 840bp 的 pTRV2 基因片段。如图 3.11 所示，无论在接种后 3d（图 3.11 a）还是 7d（图 3.11 b），缺失型 TRV 接种植株中接种叶和非接种叶的病毒积累量均显著低于野生型 TRV 接种植株。

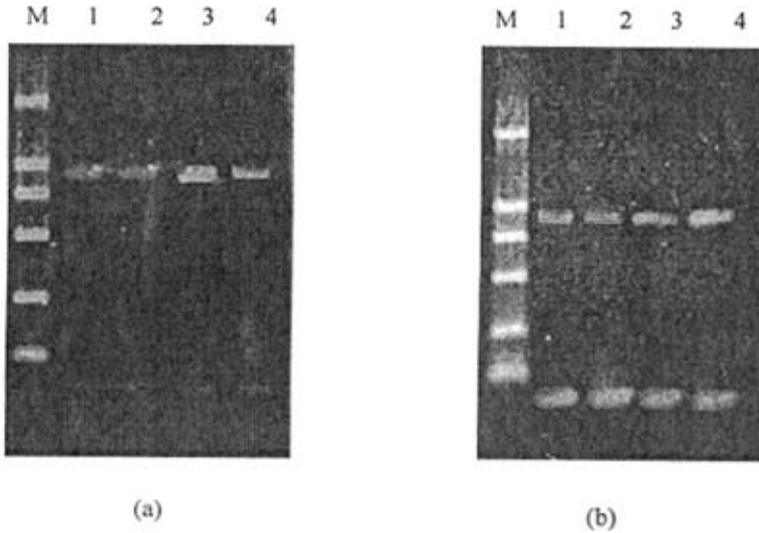


图 3.11 本氏烟植株体内 TRV 病毒积累量的 RT-PCR 分析

a: 接种后 3d ; b: 接种后 7d

供接种处理的 TRV 以及取样叶片: 泳道 1: pTRV1 Δ 16K, 接种叶; 泳道 2: pTRV1 Δ 16K, 非接种叶; 泳道 3: 野生型 pTRV1, 接种叶; 泳道 4: 野生型 pTRV1, 非接种叶; M: DL 2000 DNA Marker

Fig. 3.11 RT-PCR analysis for TRV RNA accumulation in inoculated plants

a: 3 days post inoculation ; b: 7 days post inoculation

TRV for inoculation and sampling leaves: Lane 1: pTRV1 Δ 16K, inoculation leaves; Lane 2: pTRV1 Δ 16K, uninoculation leaves; Lane 3: wild type pTRV1, inoculation leaves; Lane 4: wild type pTRV1, uninoculation leaves; M: DL 2000 DNA Marker

3 讨论

pTRV1 中的 16K ORF 全长为 306bp, 位于 19K 移动蛋白之前, 核酶和终止子之前, Liu 等证实该 16K 基因与病毒的增殖有关 (Liu *et al.*, 2002), 本研究对本氏烟植株体内病毒积累量 RT-PCR 检测分析结果表明, 16K ORF 缺失型 TRV 接种的本氏烟体内病毒积累量明显低于野生型 TRV, 该结果与 Liu 等 (2002) 的结果相符。但 16K ORF 在病毒增殖中作用的具体机理尚不清楚。

16K ORF 在基因沉默中的抑制作用早在 2002 年就有人怀疑。Liu 等 (2002) 发现, 以 CMV 2b 或 BSMV γ b 基因可以互补 16K ORF 的功能, 而 CMV 2b 和 BSMV γ b 均有基因沉默抑制子功能, 因而怀疑是 TRV 16K ORF 也可能由此功能。此后, 最近, Reavy 等人研究发现, pTRV1 编码的 16K 基因与 *lacZ* 基因特异性 dsRNA 同时表达, 降低了该

dsRNA诱导的RNAi效率，但这种抑制作用的效率很低（Reavy *et al.*, 2004）。本实验构建了16K ORF缺失型TRV，通过对缺失型TRV和野生型TRV诱导基因沉默效果的比较研究发现，在本氏烟植株上，16K ORF的缺失能略微地提高TRV诱导基因沉默植株的百分率，以及诱导沉默的重复性和稳定性；而且缺失型TRV诱导沉默的完全沉默度比野生型TRV高16%，但在三生烟中，缺失型TRV和野生型TRV均不能有效诱导基因沉默，沉默不完全，持久性不高，并产生病毒症状。这些结果表明，pTRV1中16K ORF可能是植物VIGS的弱抑制子，对植物VIGS以及在果蝇细胞RNA的抑制作用均不强烈。

今后，可以通过超表达或得到16K蛋白，进一步研究其在TRV以及其它病毒载体诱导基因沉默中的作用。

第四章 结论

1、采用病毒诱导的基因沉默技术 (VIGS) 研究明确6个*ACE*片段 (*ACE 5*、14、39、85、95和111) 相应基因在*Cf-4/Avr4*介导产生过敏性反应中的作用。*ACE14*、*ACE85*、*ACE111*基因的沉默抑制植株生长, 导致叶片畸形, 这些基因可能与植株生长发育相关; *ACE95*基因的沉默显著抑制HR的产生, 该基因可能在番茄抗叶霉病中起重要作用; 而*ACE5*和*ACE39*可能与植株生长发育和番茄抗叶霉病均不相关。

2、明确了pTRV1中16K ORF对TRV介导基因沉默及病毒的增殖的影响。构建了缺失16K ORF的pTRV1表达结构, 比较分析了野生型TRV和缺失16K ORF的TRV载体介导的基因沉默效率。发现, 缺失型TRV介导的基因沉默比野生型TRV更完全, 在本氏烟中, 基因完全沉默的植株百分率比野生型TRV增加了16%。转化缺失型TRV结构的农杆菌接种后, 植株接种叶和上部非接种叶中TRV的积累量均显著低于野生型结构转化菌接种植株。说明, pTRV1中16K ORF在病毒的增殖中起重要作用, 而且是TRV介导的基因沉默的弱抑制子。

参考文献

- [1] 王长春. 2005. 番茄 cf4 和 cf9 基因介导的过敏性反应调控及基因沉默技术的研究. 浙江大学博士学位论文
- [2] 王长春, 蔡新忠, 徐幼平. 2006. 番茄与叶霉菌互作的分子机理. 植物病理学报. 36 (5): 385-391
- [3] 陶小荣, 周雪平, 崔晓峰, 钱亚娟. 2004. 病毒诱导的基因沉默及其在植物基因功能研究中的应用. 2004. 生物化学与生物物理学进展. 31 (9): 777-783
- [4] Abbink TEM, Peart JR, Mos TNM, Baulcombe DC, Bol JF, Linthorst HJM. 2002. Silencing of a gene encoding a protein component of the oxygen-evolving complex of photosystem II enhances virus replication in plants. *Virology*. 295, 307-319
- [5] AzpirozLeehan R, Feldmann KA. 1997. T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: Going back and forth. *Trends in Genetics*. 13, 152-156
- [6] Baulcombe DC. 1999. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology*. 2, 109-113.
- [7] Benghezal M, Wasteneys GO, Jones DA. 2000. The C-terminal dilysine motif confers endoplasmic reticulum localization to type I membrane proteins in plants. *Plant Cell*. 12, 1179-1201.
- [8] Bisaro DM. 2006. Silencing suppression by geminivirus proteins. *Virology*. 344 (1): 158-168
- [9] Blatt MR, Grabov A, Brearley J, Hammond-Kosack KE, Jones JDG. 1999. K⁺ channels of Cf-9-transgenic tobacco guard cells as targets for *Cladosporium fulvum* Avr9. *Plant J*. 19, 453-462
- [10] Brigneti G, Voinnet O, Li WX, Ji LH, Ding SM, Baulcombe DC. 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressor of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J*. 17, 6739-6746
- [11] Burch-Smith TM, Anderson JC, Martin GB, Dinesh-Kumar SP. 2004. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant J*. 39, 734-746.
- [12] Burton RA, Gibeaut DM, Bacic A, Findlay K, Rberts K, Hamilton A, Baulcombe DC, Fincher GB. 2000. Virus-induced silencing of a plant cellulose synthase gene. *Plant Cell*. 12(5): 691-706
- [13] Cai XZ, Wang CC, Xu YP, Xu QF, Zheng Z, Zhou XP. 2007. Efficient gene silencing induction in tomato by a viral satellite DNA vector. *Virus Research*. in press.
- [14] Carrington JC, Ambros V. 2003. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*. 301, 336-338.
- [15] Constantin GD, Krath BN, MacFarlane SA, Nicolaisen M, Johansen IE, Lund OS. 2004. Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species. *Plant Journal*. 40, 622-631.
- [16] Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S, Baulcombe DC. 2000. An RNA-Dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*. 101, 543-553.

- [17] Dalmay T, Horsefield R, Braunstein TH, Baulcombe DC. 2001. SDE3 encodes an RNA helicase required for posttranscriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *Embo Journal*. 20, 2069-2077.
- [18] De Jong CF, Laxait AM, Bargmann BOR, De Wit PJGM, Joosten MHAJ, Munnik T. 2004. Phosphatidic acid accumulation is an early response in the Cf-4/Avr4 interaction. *Plant J*. 39, 1-12.
- [19] De Jong CF, Honee G, Joosten MHAJ, De Wit PJGM. 2000. Early defense responses induced by AVR9 and mutant analogues in tobacco cell suspensions expressing the Cf-9 resistance gene. *Physiol Mol Plant Pathol*. 56, 169-177
- [20] Dixon MS, Golstein C, Thomas CM, Van der Biezen EA, Jones JDG. 2000. Genetic complexity of pathogen perception by plants: The example of *Rcr3*, a tomato gene required specifically by Cf-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97, 8807-8811.
- [21] Dixon MS, Jones DA, Keddie JS, Thomas CM, Harrison K, Jones JD. 1996. The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell*. 84(3): 451-459.
- [22] Durrant WE, Rowland O, Piedras P, Hammond-Kosack KE, Jones JDG. 2000. cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell*. 12, 963-977
- [23] Ekengren SK, Liu Y, Schiff M, Nesh-Kumar SP, Martin GB. 2003. Two MAPK cascades, *NPR1*, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *Plant J*. 36, 905-917.
- [24] Faivre-Rampant O, Gilroy EM, Hrubikova K, Hein I, Millam S, Loake GJ, Birch P, Taylor M, Lacomme C. 2004. *Potato virus X*-induced gene silencing in leaves and tubers of potato. *Plant Physiology*. 134, 1308-1316
- [25] Flor HH. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol*. 9, 275-296.
- [26] Fofana IBF, Sangare A, Collier R, Taylor C, Fauquet CM. 2004. A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in *cassava*. *Plant Molecular Biology*. 56, 613-624.
- [27] Gabriëls SHEJ, Takken FLW, Vossen JH, De Jong CF, Liu Q, Turk SCHJ, Wachowski LK, Peters J, Witsenboer HMA, De Wit PJGM, Joosten MHAJ. 2006. cDNA-AFLP combined with functional analysis reveals novel genes involved in the hypersensitive response. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 19, 567-576.
- [28] Gonzalez-Lamothe R, Tsitsigiannis DI, Ludwig AA, Panicot M, Shirasu K, Jones JDG. 2006. The U-Box protein CMPG1 is required for efficient activation of defense mechanisms triggered by multiple resistance genes in tobacco and tomato. *Plant Cell*. 18, 1067-1083.
- [29] Gossele V, Fache I, Meulewaeter F, Cornelissen M, Metzlaiff M. 2002. SVISS-a novel transient gene silencing system for gene function discovery and validation in tobacco plants. *Plant J*. 32 (5): 859-866
- [30] Guo HS, Ding SW. 2002. A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO J*. 21, 398-407
- [31] Hamilton A J, Baulcombe DC. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*. 286, 950-952.
- [32] Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, Baulcombe D. 2002. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *Embo J*. 21, 4671-4679.

- [33] Hammond SM, Bemstein E, Beach D, Hannon GJ. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional genesilencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 404, 293-296.
- [34] Hammond-Kosack KE, Jones DA, Jones JDG. 1994. Identification of Two Genes Required in Tomato for Full *Cf-9*-Dependent Resistance to *Cladosporium fulvum*. *Plant cell*. 6, 361-374.
- [35] Hammond-Kosack KE, Parker JE. 2003. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr Opin Biotechnol*. 14:,177-193.
- [36] Hein I, Barciszewska-Pacak M, Hrubikova K, Williamson S, Dinesen M, Soenderby Ida E, Sundar S, Jarmolowski A, Shirasu K, Lacomme C. 2005. Virus induced gene silencing-based functional characterization of genes associated with powdery mildew resistance in barley. *Plant Physiol*. 138 (4): 2155-2164
- [37] Holzberg S, Brosio P, Gross C, Pogue GP. 2002. *Barley stripe mosaic virus* induced gene silencing in monocot plant. *Plant J*. 30 (3): 315-327
- [38] Hong W, Xu YP, Zheng Z, Cao JS, Cai XZ. 2007. Comparative transcript profiling by cDNA-AFLP reveals similar patterns of *Avr4/Cf-4* and *Avr9/Cf-9*-dependent defence gene expression. *Molecular Plant Pathology*. accepted
- [39] Jones DA, Thomas CM, Hammond-Kosack KE, Balint-Kurti.Peter J, Jones JDG. 1994. Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science*. 266, 789-93.
- [40] Joosten M, Joosten MHAJ, De Wit PJGM. 1999. The tomato-*Cladosporium fulvum* interaction: a versatile experimental system to study plant-pathogen interactions. *Annu Rev Phytopatho*. 37, 355-367
- [41] Joosten MHAJ, Cozijnsen TJ, De Wit PJGM. 1994. Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. *Nature*. 367, 384-386.
- [42] Joosten MHAJ, Vogelsang R, Cozijnsen TJ, Verberne MC, Dewit PJGM. 1997. The biotrophic fungus *Cladosporium fulvum* circumvents *Cf-4*-mediated resistance by producing unstable *AVR4* elicitors. *Plant Cell*. 9, 367-379.
- [43] Kjemtrup S, Sampan KS, Peele CG, Nguyen LV, Conkling MA, Thompson WF, Robertson D. 1998. Gene silencing from plant DNA carried by a Geminivirus. *Plant J*. 14 (1): 91-100
- [44] Kobe B, Kajava AV. 2001. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol*. 11, 725-732.
- [45] Kooman Gersmann M, Vogelsang R, Hoogendijk ECM, Dewit PJGM. 1997. Assignment of amino acid residues of the *AVR9* peptide of *Cladosporium fulvum* that determine elicitor activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 10, 821-829.
- [46] Kooman-Gersmann M, Honee G, Bonnema G, and De Wit PJGM. 1996. A high-affinity binding site for the *Avr9* peptide elicitor of *Cladosporium fulvum* is present on plasma membranes of tomato and other solanaceous plants. *Plant Cell*. 8, 929-938.
- [47] Kooman-Gersmann M, Vogelsang R, Vossen P, Van den HoovenHW, Mahe E, Honee G, De Wit PJGM. 1998. Correlation between binding affinity and necrosis-inducing activity of mutant *AVR9* peptide elicitors. *Plant Physiology*. 117, 609-618.
- [48] Kruger J, Thomas CM, Golstein C, Dixon MS, Smoker M, Tang S, Mulder L, Jones JDG. 2002. A tomato cysteine protease required for *Cf-2*-dependent disease resistance and suppression of

- autonecrosis. *Science*. 296, 744-747
- [49] Kumagai MH, Donson J, Della-Cioppa G, Hanley K, Griel LK. 1995. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc Natl Acad Sci.USA*. 92 (5): 1679-1683
- [50] Lakatos L, Csroba T, Pantaleo V, Chapman EJ, Carrington JC, Liu YP, Dolja VV, Calvino LF, Lopez-Moya J. 2006. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J*. 25 (12): 2768-2780
- [51] Laurent F, Labesse G, De Wit P. 2000. Molecular cloning and partial characterization of a plant VAP33 homologue with a major sperm protein domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 270, 286-292.
- [52] Liu H, Reavy B, Stuart A, MacFarlane MS. 2002. Functional Replacement of the *Tobacco rattle virus* Cysteine-rich Protein by Pathogenicity Proteins from Unrelated Plant Viruses. *Virology*. 298, 232-239
- [53] Liu Y, Burch-Smith T, Schiff M, Feng S, Dinesh-kumar SP. 2004a. Molecular chaperone HSP90 associates with resistance protein N and its signaling proteins SGT1 and RAR1 to modulate an innate immune response in plants. *J Biol Chem*. 279, 2101-2110
- [54] Liu Y, Schiff M, Dinesh Kumar SP. 2004b. Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY / MYB transcription factors, *Col 1* and *CRT1* in N mediated resistance to *tobacco mosaic virus*. *Plant J*. 38, 800-809
- [55] Liu Y, Schiff M, Marathe R, Dinesh Kumar SP. 2002. Tobacco *Rar1*, *EDSI* and *Npr1*, NIM like genes are required for N-mediated resistance to *tobacco mosaic virus*. *Plant J*. 30 (4): 415-429
- [56] Llave C, Kasschau KD, Carrington JC. 2000. Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *PNAS*. 97 (24): 13401-13406
- [57] Lu R, Malcuit I, Moffett P, Ruiz MT, Peart J, Wu AJ, Rathjen JP, Bendahmane A, Day L, Baulcombe DC. 2003a. High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *Embo Journal*. 22, 5690-5699
- [58] Lu R, Martin-Hernandez AM, Peart JR, Malcuit I, Baulcombe DC. 2003b. Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*. 30, 296-303
- [59] Luderer R, Rivas S, Nurnberger T, Mattei B, Van den Hooven HW, Van der Hoorn RAL, Romeis T, Wehrhritz JM, Blume B, Nennstiel D, Zuidema D, Vervoort J, De Lorenzo G, Jones JDG, De Wit PJGM, Joosten MHAJ. 2001. No evidence for binding between resistance gene product *Cf-9* of tomato and avirulence gene product *AVR9* of *Cladosporium fulvum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14, 867-876.
- [60] Luderer R, Takken FLW, De Wit PJGM, Joosten MHAJ. 2002. *Cladosporium fulvum* overcomes *Cf-2*-mediated resistance by producing truncated *AVR2* elicitor proteins. *Molecular Microbiology*. 45, 875-884
- [61] Marmeisse R, Van den Ackerveken GFJM, Goosen T, De Wit PJGM, Van den Broek HWJ. 1993. Disruption of the avirulence gene *avr9* in *Cladosporium fulvum* causes virulence on tomato genotypes with the complementary resistance gene *Cf-9*. *Mol Plant-Microbe Interact*. 6, 412-417.
- [62] Martin GB, Bogdanove AJ, Sessa G. 2003. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology*. 54, 23-61.

- [63] Martin,GB, Brommonschenkel SH, Chunwongse J. 1993. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*. 262, 1432-1436.
- [64] May MJ, Hammond-Kosack KE, Jones JDG. 1996. Involvement of reactive oxygen species, glutathione metabolism, and lipid peroxidation in the *Cf*-gene-dependent defense response of tomato cotyledons induced by race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum*. *Plant Physiol*. 110, 1367-1379
- [65] Merai Z, Kerenyi Z, Kertesz S, Magna M, Lakatos L, Silhavy D. 2006. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *Journal of virology*. 80 (12): 5747-5756
- [66] Nekrasov V, Ludwig AA, Jones JDG. 2006. CITRX thioredoxin is a putative adaptor protein connecting *Cf-9* and the *ACIK1* protein kinase during the *Cf-9/Avr9*- induced defence response. *FEBS Letters*. 580, 4236-4241
- [67] Omarov R, Spaeks K, Smith L, Zindovic J, Scholthof HB. 2006. Biological relevance of a stable biochemical interaction between the tombusvirus-encoded P19 and short interfering RNAs. *Journal of Virology*. 80 (6): 3000-3008
- [68] Parniske M, Wulff BBH, Bonnema G, Thomas CM, Jones DA, Jones JDG. 1999. Homologues of the *Cf-9* disease resistance gene (*Hcr9s*) are present at multiple loci on the short arm of tomato chromosome 1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 12, 93-102.
- [69] Peart JR, Lu R, Sadanandom A, Malcuit L, Moffett P, Brice DC, Schauser L, Jaggard DAW, Xiao SY, Coleman MJ, Dow M, Jones JDG, Shirasu K, Baulcombe DC. 2002. Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99, 10865-10869.
- [70] Peele C, Jordan CV, Muangsan N, Turnage M, Egelkroun E, Eagle P, Hanley-Bowdoin L, Robertson D. 2001. Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors. *Plant J*. 27 (4): 357-366
- [71] Peever TL, Higgins VJ. 1989. Electrolyte leakage lipoxygenase and lipid peroxidation induced in tomato leaf tissue by specific and nonspecific elicitors from *Cladosporium fulvum*. *Plant Physiol*. 90, 867-875.
- [72] Perez-Garcia A, Snoeijs SS, Joosten MHJ, Goosen T, De Wit PJGM. 2001. Expression of the avirulence gene *Avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* is regulated by the global nitrogen response factor NRF1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14, 316-325.
- [73] Pfeffer S, Dunoyer P, Heim F, Richards KE, Jonard G, V. 2002. Ziegler-Graff, P0 of *beet Western yellows virus* is a suppressor of post-transcriptional gene silencing. *Virol J*. 76, 6815-6824.
- [74] Piedras P, Hammond-Kosack KE, Harrison K, Jones JDG. 1998. Rapid, *Cf-9*- and *Avr9*-dependent production of active oxygen species in tobacco suspension cultures. *Mol Plant-Microbe Interact*. 11, 1155-1166
- [75] Piedras P, Rivas S, Droge S, Hillmer S, Jones JDG. 2000. Functional, c-myc-tagged *Cf-9* resistance gene products are plasma-membrane localized and glycosylated. *Plant J*. 21, 529-536.
- [76] Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC. 2001. *Tobacco rattle virus* as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J*. 25 (2):237
- [77] Reavy B, Dawson S, Canto T, MacFarlan SA. 2004. Heterologous expression of plant virus genes

- that suppress post-transcriptional gene silencing results in suppression of RNA interference in *Drosophila* cells. *BMC Biotechnology*. 4, 18-27
- [78] Rivas S, Rougon-Cardoso A, Smoker M, Schauser L, Yoshioka H, Jones JDG. 2004. CITRX thioredoxin interacts with the tomato *Cf-9* resistance protein and negatively regulates defence. *EMBO J*. 23, 2156-2165.
- [79] Robertson D. 2004. VIGS vectors for gene silencing: Many targets, many tools. *Annual Review of Plant Biology*. 55, 495-519.
- [80] Romeis T, Ludwig AA, Martin R, Jones JDG. 2001. Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO J*. 20 (20): 5556
- [81] Romeis T, Piedras P, Jones JDG. 2000. Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. *Plant Cell*. 12, 803-815
- [82] Romeis T, Piedras P, Zhang S, Klessig DF, Hirt H, Jones JDG. 1999. Rapid *Avr9*- and *Cf-9*-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell*. 11, 273-287
- [83] Rooney HCE, Vant Klooster JW, Van der Hoorn RAL, Joosten MHAJ, Jones JDG, De Wit PJGM. 2005. *Cladosporium Avr2* inhibits tomato Rcr3 protease required for *Cf-2*-dependent disease resistance. *Science*. 308, 1783-1786
- [84] Rowland O, Ludwig AA, Merrick CJ, Baillieux F, Tracy FE, Durrant WE, Fritz-Laylin L, Nekrasov V, Sjolander K, Yoshioka H, Jones JD. 2005. Functional analysis of *Avr9/Cf-9* rapidly elicited genes identifies a protein kinase, *ACIK1*, that is essential for full *Cf-9*-dependent disease resistance in tomato. *Plant Cell*. 17, 295-310
- [85] Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC. 1998. Initiation and Maintenance of Virus-Induced Gene Silencing. *Plant Cell*. 10, 937-946
- [86] Scofield SR, Htmng L, Brandt AS, Gill BS. 2005. 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. *Plant Physiol*. 138, 2165-2173
- [87] Seear PJ and Dixon MS. 2003. Variable leucine-rich repeats of tomato disease resistance genes *Cf-2* and *Cf-5* determine specificity. *Molecular Plant Pathology*. 4, 199-202.
- [88] Silhavy D, Molnar A, Lucioli A, Szittya G, Hornyik C, Tavazza M, Burgyan J. 2002. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21-25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J*. 21, 3070-3080.
- [89] Suzan HEJ, Gabriels Jack H, Vossen, Sophia K, Ekengren, Gerben Van O, Ahmed M, Abd-El-Halim, Grady CM, Van den B, Daphne Y, Raine Y, Gregory B, Martin, Frank LW, Takken Pierre JGM, De Wit, Matthieu HAJ, Joosten. 2006. cDNA-AFLP Combined with Functional Analysis Reveals Novel Genes Involved in the Hypersensitive Response. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 19 (6): 567-576
- [90] Swiderski MR, Innes RW. 2001. The *Arabidopsis PBS1* resistance gene encodes a member of a novel protein kinase subfamily. *Plant J*. 26, 101-112.
- [91] Takken FLW, Schipper D, Nijkamp HJJ, Hille J. 1998. Identification and Ds-tagged isolation of a new gene at the *Cf-4* locus of tomato involved in disease resistance to *Cladosporium fulvum* race 5. *Plant J*. 14, 401-411.

- [92] Tameling WIL, Elzinga SDJ, Darmin PS, Vossen JH, Takken FLW, Haring MA, Cornelissen BJC. 2002. The tomato *R* gene products I-2 and Mi-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. *Plant Cell*. 14, 2929-2939.
- [93] Tao XR, Zhou X.P. 2004. A modified viral satellite DNA that suppresses gene expression in plants. *Plant J*. 38, 850-860.
- [94] Thomas CM, Jones DA, Parniske M, Harrison K, Balint-Kurti PJ, Hatzixanthis K., Jones JDG. 1997. Characterization of the tomato *Cf-4* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequences that determine recognitional specificity in *Cf-4* and *Cf-9*. *Plant Cell*. 9, 2209-2224.
- [95] Trinks D, Rajeswaran R, Shivaparasad PV, Akbergenov R, Oakeley EJ, Veluthambi K, Hohn T, Pooggin MA. 2006. Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with Transactivation of host genes. *Journal of Virology*. 79 (4): 2517-2527
- [96] Turnage MA, Muangsan N, Peele CG, Roberston D. 2002. Geminivirus-based vectors for gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant J*. 30 (1): 107 -114
- [97] Valentine T, Shaw J, Blok VC, Phillips MS, Oparka KJ, Lacomme C. 2004. Efficient virus-induced gene silencing in roots using a modified *tobacco rattle virus* vector. *Plant Physiology*. 136, 3999-4009.
- [98] Van den Ackerveken GF, Vossen P, De Wit PJGM. 1993. The *AVR9* race-specific elicitor of *Cladosporium fulvum* is processed by endogenous and plant proteases. *Plant Physiol*. 103, 91-96.
- [99] Van den Burg HA, Westerink N, Francoijs KJ, Roth R, Woestenenk E, Boeren S, De Wit PJGM, Joosten MHAI, Vervoort J. 2003. Natural disulfide bond-disrupted mutants of *AVR4* of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are sensitive to proteolysis, circumvent *Cf-4*-mediated resistance, but retain their chitin binding ability. *Journal of Biological Chemistry*. 278, 27340-27346.
- [100] Van den Hooven HW, Van den Burg HA, Vossen P, Boeren S, De Wit PJGM, Vervoort J. 2001. Disulfide bond structure of the *AVR9* elicitor of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*: Evidence for a cystine knot. *Biochemistry*. 40, 3458-3466.
- [101] Van der Hoorn RAL, Roth R, De Wit PJG. 2001a. Identification of distinct specificity determinants in resistance protein *Cf-4* allows construction of a *Cf-9* mutant that confers recognition of avirulence protein AVR4. *Plant Cell*. 13, 273-285
- [102] Van der Hoorn RAL, Van der Ploeg A, De Wit PJGM, Joosten MHAI. 2001b. The C-terminal dilysine motif for targeting to the endoplasmic reticulum is not required for *Cf-9* function. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14, 412-415.
- [103] van der Hoorn RAL, Wulff BBH, Rivas S, Durrant MC, Van der Ploeg A, De Wit PJGM, Jones JDG. 2005. Structure-function analysis of *Cf-9*, a receptor-like protein with extracytoplasmic leucine-rich repeats. *Plant Cell*. 17, 1000-1015.
- [104] Van Kan JA, Van den Ackerveken GF, De Wit PJGM. 1991. Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene *avr9* of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 4, 52-59.
- [105] Voinnet C, Lederer DC, Baulcombe. 2000. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell*. 103, 157-167.
- [106] Voinnet O. 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet*. 17

- (8): 449-459
- [107] Voinnet YM, Pinto DC, Baulcombe. 1999. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl Acad Sci.* 96, 4147-4152.
- [108] Wassenegger M, Elissies TP. 1998. A model for RNA mediated gene silencing in higher plants. *Plant Mol Biol.* 37, 349-362.
- [109] Westerink N, Brandwagt BF, De Wit PJGM, Joosten MHJ. 2004. *Cladosporium fulvum* circumvents the second functional resistance gene homologue at the *Cf-4* locus (*Hcr9-4E*) by secretion of a stable *avr4E* isoform. *Molecular Microbiology.* 54, 533-545.
- [110] Wilson RJ, Baillie BK, Jones DA. 2005. ER retrieval of *Avr9* compromises its elicitor activity consistent with perception of *Avr9* at the plasma membrane. *Molecular Plant Pathology.* 6, 193-197.
- [111] Wulff BBH, Kruijt M, Collins PL, Thomas CM, Ludwig AA, De Wit PJGM, Jones JDG. 2004. Gene shuffling-generated and natural variants of the tomato resistance gene *Cf-9* exhibit different auto-necrosis-inducing activities in *Nicotiana* species. *Plant J.* 40, 942-956.
- [112] Wulff BBH, Thomas CM, Smoker M, Grant M, Jones JDG. 2001. Domain swapping and gene shuffling identify sequences required for induction of an *Avr*-dependent hypersensitive response by the tomato *Cf-4* and *Cf-9* proteins. *Plant Cell.* 13, 255-272.
- [113] Xu YP, Zheng LP, Xu Qf, Wang CC, Zhou XP, Wu ZJ and Cai XZ. 2007. Efficiency for gene silencing induction in *Nicotiana* species by a viral satellite DNA vector. *Journal of Integrative Plant Biology.* Accepted.
- [114] Yoshioka H, Numata N, Nakajima K, Katou S, Kawakita K, Rowland O, Jones JDG, Doke N. 2003. *Nicotiana benthamiana* gp91(phox) homologs NbrbohA and NbrbohB participate H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell.* 15, 706-718
- [115] Zhang XR, Yuan YR, Pei Y, Lin SS, Tuschl T, Patel DJ, Chua NH. 2006. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Gen. Dev.* 20 (23): 3255-3268

致谢

本论文是在导师吴祖建副研究员和蔡新忠教授的精心指导下完成的。两位导师严谨的治学态度、利落的行事作风、强烈的敬业精神、敏锐的学术洞察力和渊博的学识，深深地影响着我。在读期间，有幸聆听了谢联辉教授和林奇英研究员的教诲，他们精湛的学术水平和独特的气质给学生留下了深刻的印象，使我受益匪浅。

感谢实验室和导师吴祖建副研究员提供了去浙江大学学习和交流的机会，虽然只是短短的一年时间，但却使学生开拓了眼界，拓宽了知识；使我长大了许多，也成熟了许多。

感谢导师蔡新忠教授，在我乍到浙大，在生活上为我提供的方便，特别感谢导师在实验上对我耐心地教导，给予我充分思考的空间和对学生的信任，从导师身上学到的不仅仅是实验技术，更多的是实验思路和为人处事的道理。同时还要感谢师母徐幼平老师，谢谢您在实验中提供的帮助以及在生活和工作中的对学生的关心，在此，祝您和蔡老师幸福快乐！

感谢导师吴祖建副研究员对学生的栽培，从本科三年级到硕士阶段这五年时间里，在学习、生活、工作上对学生的帮助和关心，学生的进步离不开您的指导和鼓励。还要感谢师母谢荔岩老师这么多年来，无论是在学习、实验中，还是在生活、工作上都给了我很多帮助和建议，特别是在浙大求学的一年，谢谢您时常给学生挂电话，给我鼓励，谢谢您对我的关爱，在此，祝您和吴老师幸福美满！

感谢浙江大学周雪平教授、李红叶教授和吴建祥副教授对我实验和生活的关心，感谢您们对实验提出的宝贵意见和热忱的帮助。

感谢福建农林大学谢晓琼老师及其家人，在求学路上给我的莫大帮助。感谢山东农业大学刘振宇老师对我鼓励和帮助。

感谢在浙江大学共处一年的实验室研究生们对我贴心的照顾。感谢徐秋芳博士生、张志新硕士生和曹文渊本科生在实验上的帮助，如果没有了他们无私的帮助，相信我的论文不可能顺利完成。感谢郭小勤博士、张红志硕士、周鑫硕士在实验和生活中给予我的帮助。感谢李红叶老师实验室的王继业博士生、张江涛硕士生和礼茜硕士生实验上的帮助。

感谢福建农林大学病毒所钟伏弟博士生将我带入五彩缤纷的分子生物学世界，让我在其中能自由翱翔。非常感谢林董博士生、杨金广博士生、鹿连明博士生和韩凤英硕士把我当成不懂事的小妹妹来包容和照顾。感谢林素珠老师、连玲丽博士生、丁新伦博士生、程文金博士生和陈良华硕士对我的帮助。

感谢和我一样来自同一学校在浙江大学交流的柯金聪硕士生、胡伯里硕士生、王海民硕士生和邓凤林硕士生生活和实验中对我的帮助，愿你们能学有所成！

感谢我的两位好朋友姚锦爱硕士生和陈凌华硕士生，谢谢你们这么多年来对我的支持、鼓励和帮助。

感谢那些曾经帮助过我，但本文未提及的老师、同学和朋友们。

本研究得到了教育部霍英东教育基金会第十届高等院校青年教师基金（No.101032）和国家自然科学基金（No.30671352）项目的资助，在此表示感谢。

最后，我要感谢我最最亲爱的父亲、母亲和其它家人在我求学路上一路的理解、支持、鼓励和关爱，让我能顺利地完成了硕士学业！谢谢！

郑世平

附录

YEB 液体培养基: 牛肉浸膏 5g, 酵母提取物 1g, 蛋白胨 5g, 1M MgSO₄ 2 ml, 调 pH 至 7.0, 定容至 1000 ml, 高压灭菌后保存

YEBi: 在 1L YEB 中加入 100 mg/ml Kan 100 μ l, 200 mM 乙酰丁香酮 10 μ l, 1M MES 1 ml

MMAi: MS 盐 5 g, MES 1.95 g, 蔗糖 20 g, 调 pH 至 5.6, 200 μ M 乙酰丁香酮 100 μ l, 定容至 1000 ml (无菌水配制)

LB 液体培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母抽提物 5 g, 氯化钠 10 g, 加 950 ml 蒸馏水溶解, 用 5 M 氢氧化钠调 pH 至 7.0, 定容至 1000 ml, 高压灭菌后保存

LB 固体培养基: 每升 LB 液体培养基中加入 12 g 琼脂粉, 高压灭菌后保存

溶液 I: 葡萄糖 2.25 g, 50 mmol/L; 1mol/L Tris-Cl(pH8.0) 6.25 ml, 20 mmol/L; 0.5mol/L EDTA(pH8.0) 5 ml, 10 mmol/L; 调pH至8.0后, 用水定容至250 ml, 高压灭菌后保存

溶液 II: 10 mol/L NaOH 2 ml; 10% SDS, 10 ml; 用水定容至100 ml, 现配现用

溶液 III: 5 mol/L 醋酸钾 60ml, 冰醋酸 11.5ml, 水 28.5 ml, 高压灭菌后保存

5 \times TBE 缓冲液: Tris 碱 54 g, 硼酸 27.5 mg, 0.5 mol/L EDTA (pH8.0) 20 ml, 加水定容至 1000 ml, 0.5 \times 使用

大量元素 (1L): 七水硫酸镁 370 mg, 磷酸二氢钾 170 mg, 硝酸钾 1900 mg, 硝酸氮 1650 mg, 二水氯化钙 440 mg

微量元素 (1L): 硼酸 6.2 mg, 一水硫酸锰 15.6 mg, 七水硫酸锌 8.6 mg, 二水钼酸钠 0.25 mg, 五水硫酸铜 0.025 mg, 六水氯化钴 0.025 mg, 碘化钾 0.83 mg, 七水硫酸亚铁 27.8 mg, 乙二胺二乙酸二钠 37.3 mg

攻读硕士学位期间发表的论文

- [1] Xu YP, Zheng LP (并列第一作者), Xu QF, Wang CC, Zhou XP, Wu ZJ, and Cai XZ. Efficiency for gene silencing induction in *Nicotiana* species by a viral satellite DNA vector. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2007. Accepted (SCI)
- [2] 林董, 郑璐平, 谢荔岩, 吴祖建, 林奇英, 谢联辉. GFP-SP 融合基因表达载体的构建及其在 sf9 细胞中的表达. *植物病理学报*. 2007. 已接收

作者: [郑璐平](#)
学位授予单位: [福建农林大学](#)

参考文献(3条)

1. [王长春](#) [番茄Cf-4和Cf-9基因介导的过敏反应调控及基因沉默技术的研究](#)[学位论文]博士 2005
2. [王长春](#), [蔡新忠](#), [徐幼平](#) [番茄与叶霉菌互作的分子机理](#)[期刊论文]-[植物病理学报](#) 2006(05)
3. [陶小荣](#), [周雪平](#), [崔晓峰](#), [钱亚娟](#) [病毒诱导的基因沉默及其在植物基因功能研究中的应用](#)[期刊论文]-[生物化学与生物物理进展](#) 2004(09)

本文读者也读过(3条)

1. [李国钧](#) [水稻和番茄S-亚硝基谷胱甘肽还原酶基因的克隆鉴定与生化功能分析](#)[学位论文]2007
2. [洪薇](#) [番茄抗叶霉病分子机理及抗病相关基因分离技术体系的建立](#)[学位论文]2007
3. [张俊红](#) [番茄Aux/IAA基因的克隆与功能分析](#)[学位论文]2006

引用本文格式: [郑璐平](#) [番茄抗叶霉菌相关基因的鉴定及TRV 16K基因的功能分析](#)[学位论文]硕士 2007