

狗尾草花叶病毒的农杆菌侵染性克隆构建与应用

王婷, 张海峰, 刘妮娜, 程晓东, 廖乾生

(浙江理工大学生命科学院生物工程研究所, 杭州 310018)

摘要: 狗尾草花叶病毒(*Foxtail mosaic virus*, FoMV) 是马铃薯 X 病毒属 (*Potexvirus*) 成员, 寄主范围广泛, 尤其可感染水稻、小麦、玉米等多种粮食作物。它与马铃薯 X 病毒 (*Potato virus X*, PVX) 的基因组结构与组成十分相似, 但目前对于 PVX 的基础性研究已经完成, 被作为 VIGS 载体以及外源蛋白的表达载体广泛应用于双子叶植物中, 而在国内外利用 FoMV 作为载体的研究还报道甚少。本研究将 FoMV 基因组全序列克隆到携带有精确转录 35S 启动子的载体 pCB301, 获得完整的重组质粒, 通过浸润接种本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*) 和转基因本氏烟 RDR6 (*N.benthamiana* RDR6), 观察植物症状反应, 进行病毒验证, 确定其具有侵染活性, 然后将病毒转接至单子叶植物大麦 (*Hordeum vulgare*) 上, 植株表现出轻微花叶和条纹式退绿等症状, 继而提取寄主总 RNA, 通过 TBE 电泳和 RT-PCR 方法进行病毒验证, 从而成功构建了基于 FoMV 的农杆菌侵染性克隆 pFoMV-wt; 并在此基础上进行改造, 构建了其候选 VIGS 载体 (pFoMV-VIGS), 以及分别插入 GFP ORF 片段和来自大麦 (*H.vulgare* *Movex*) 的内源 PDS 基因的克隆 pFoMV-GFP、pFoMV-PDS。但此三种新的重组病毒在本氏烟上无症状表现, 在大麦上却表现出同 pFoMV-wt 一样的症状, 并未发生基因沉默效应和显现绿色荧光, 本文推测其发生了基因重组现象, 造成插入片段丢失, 导致改造的 FoMV 恢复成野生型病毒, 而转基因所加入的外源基因片段的长度, 以及所插入外源基因的位置有可能是导致这一结果的原因。此外, 文章对影响该病毒活性的载体结构、不同寄主上的侵染方式、病毒含量的高低以及寄主品种差异等都做了相关研究, 为进一步构建 FoMV 的基因沉默载体研究奠定了基础, 也为单子叶植物功能基因组的研究提供了重要理论支持和技术铺垫。

关键词: 植物病毒学; 狗尾草花叶病毒; 农杆菌侵染性克隆; 本氏烟; 大麦; 外源基因
中图分类号: Q945.8

Construction and application of Agrobacterium-mediated *Foxtail mosaic virus* infectious cDNA clones vector

WANG Ting, ZHANG Haifeng, LIU Nina, CHENG Xiaodong, LIAO Qiansheng
(Institute of Bioengineering, School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, HangZhou 310018)

Abstract: *Foxtail mosaic virus* (FoMV) has a broad host range, infecting rice, wheat, corn and other grain crops as a species of the genus *Potexvirus*. Its genome structure resembles that of *Potato virus X* (PVX), and the gene functions are presumed to be similar as well. Over the past few years, PVX was used to express a large number of foreign proteins and developed as virus-induced gene silencing vector in the Poaceae plants. Vector using FoMV have been reported internationally less until now. In this study, the complete sequence of FoMV cDNAs was cloned into vector pCB301 which carrying duplicated 35S promoter. Get the right recombinant plasmid and transformed into *Agrobacterium* GV3101, it was then infiltrated into *Nicotiana benthamiana* and *N.benthamiana* RDR6. Observe the symptoms and determine the activity of *Agrobacterium*-mediated infectious clone. The virus inoculated to *Hordeum vulgare* via sap-mechanically in four varieties. there are symptoms similar as light mosaic and line pattern greenness showed on maturing leaves. Construct the *Agrobacterium*-mediated infectious clone successfully named pFoMV-wt by the molecular detection results with the viral RNA were detected via TBE electrophoresis result of the total RNA and RT-PCR. On the basis of pFoMV-wt, to renovate and build new clone and this recombinant clone as a candidate VIGS vector

作者简介: 王婷, (1988-), 女, 硕士研究生, 植物病毒与天然药物生物反应器。

通信联系人: 廖乾生, (1975-), 男, 副研究员, 植物病毒与天然药物生物反应器。E-mail: qshliao@yahoo.com.cn

(pFoMV-VIGS). Followed, the GFP ORF fragment and endogenous PDS fragment from *H. vulgare* *Movex* were inserted into the pFoMV-VIGS, and were named pFoMV-PDS, pFoMV-GFP. The pFoMV-VIGS, pFoMV-PDS, pFoMV-GFP inoculated to the *N.benthamiana* by infiltration inoculation followed, but the plant did not show symptoms, and molecular test results showed that the infection failed also. Via inoculating *H.vulgare* *Movex* with extracts from *N.benthamiana* leaves infected with different kinds of recombinant virus, we found that three recombinant virus inoculated leaves showed similar phenotypes to pFoMV-wt inoculated leaves, there is no gene silencing phenomenon and green fluorescent appeared in leaves under UV light, the result reminded us that there is no gene silencing happened in these inoculated leaves. We conjectured that virus got gene recombination in inoculated leaves is responsible for the loss of inserted-fragment, which may cause reversemutation of the three recombinant virus and recover to pFoMV-wt, the length and sites of inserted-fragment and the choice of MCS may affects the result. In addition, there are some researches about the structure of vector and infection ways on different host plant and virus content and host species that may be affect the activity of FoMV in this study. It makes a foundation for constructing FoMV-VIGS further and provides an important theoretical and technical support for functional genomics research of monocotyledons.

Keywords: plant virology; *Foxtail mosaic virus*; *Agrobacterium-infections* clone; *Nicotiana benthamiana*; *Hordeum vulgare*; Foreign gene

0 引言

狗尾草花叶病毒 (*Foxtail mosaic virus*, FoMV) 隶属 *Potexvirus*, 可感染小麦、玉米等 56 种单子叶植物和至少 35 种双子叶植物, 主要侵染植物分生组织和生长点, 症状温和, 且首先发生在成熟叶而非新生叶。FoMV 最初发现于美国堪萨斯州利文沃斯 (Leavenworth, Kansas) 的一处麦田, 作为一种汁液传播病毒被首次分离于狗尾草中, 由 A. Q. Paulsen and C. L. Niblett 最初命名为 FMV^[1,2]。1999 年 Harvey 等首次用 FoMV 感染了高粱, 使其寄主范围扩展到谷类作物^[3]。目前研究表明, FoMV 不同于其他已知禾本科汁液传播病毒^[4], 可能通过种子传播, 但还未能从禾谷类植物中分离出来, 因此目前对其天然载体及其造成的粮食减产的机制原理均处于未知状态^[1]。

FoMV 是单组份、单链、正义 RNA 病毒, 基因组大小约 6.2kb, 种传病毒。与马铃薯 X 病毒 (PVX) 同属于马铃薯 X 病毒属, 基因组结构与组成十分相似^[5-7], 也具有 5'端帽子和 3'端多聚腺苷酸尾巴, 主要编码 5 个阅读框 (ORF), ORF1 是编码 152 kDa 的复制酶相关蛋白, 2.1kb 的亚基因组分别编码 TGB1 (26kDa)、TGB2 (1.3kDa) 和 TGB3 (5.8kDa) 及 ORF 5A 蛋白, 0.9kb 的亚基因组编码 24kDa 的外壳蛋白。1991 年关于 FoMV 的基因组序列被首次报道 (基因序列号: NC_001483), 2008 年有报道称对其基因序列做出修改, 并表明此病毒序列中三重基因块在结构上也类似于 PVX^[8]。综合 FoMV 诸多特征, 它都有可能变成好的 VIGS 载体。一个载体中完整的亚基因组启动子对于亚基因组和靶蛋白的积累是非常重要的, 而在 FoMV 中亚基因组启动子的有效作用界限还未确切划分出来^[9]。

目前单子叶植物功能基因组研究主要依赖于基因的自然突变, T-DNA 插入突变及转基因介导的 RNA 沉默^[10]。虽然这些方法已取得许多结果, 却非常耗时, T-DNA 插入的基因数目也有限, 导致研究基因没有插入突变体。VIGS 方法相对节省时间, 即是反向又是正向遗传学方法, 能分析所有基因, 是前些方法的巨大补充。目前大多数 VIGS 载体仅能用于双子叶植物, 在单子叶植物中仅有 BSMV-VIGS 和 BMV-VIGS 载体可用, 但二者均存在操作复杂, 耗时耗资的缺陷, 还不能进行大规模的基因功能分析^[11, 12], 所以需要构建新的单子叶植物 VIGS 载体。

本项目基于 FoMV 构建它的农杆菌侵染性克隆载体, 从而在其基础上进行改造, 发展

一个新的快速研究小麦、玉米等重要粮食作物基因功能的病毒诱导的基因沉默载体，构建能
95 系统性侵染单子叶植物的FoMV农杆菌侵染性克隆和候选FoMV-VIGS载体以及含有大麦内
源 PDS 基因以及绿色荧光蛋白 GFP 基因的 FoMV-PDS、FoMV-GFP，为单子叶植物的功能
基因组的研究提供快速高效的研究工具。

1 材料与方法

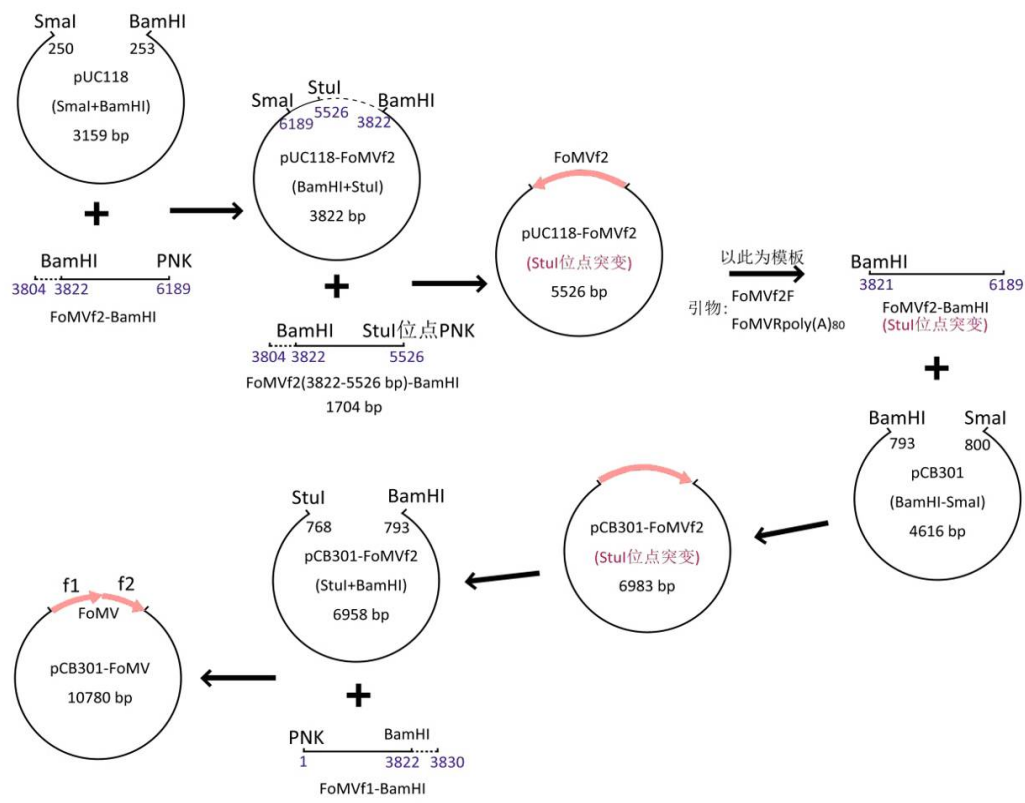
1.1 材料

载体：FoMV-P9 的 cDNA 克隆、pCB301 载体和 pUC118 载体
100 寄主：本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*)、转基因本氏烟 RDR6 (*N.benthamiana* RDR6)、
大麦 (*Hordeum vulgare*) 4 个品种 (*Golden Promise*, *Ingrid*, *Movex*, *Pallas*) 幼苗于日光防虫
温室，控温 25℃、16 小时光周期培养。

1.2 方法

1.2.1 pCB301-FoMV 重组质粒的分段克隆

105 PCR 扩增大小为 3800bp (f1 片段) 和 2400bp (f2 片段) 左右的 FoMV 两个片段，首先
将 f2 片段克隆到载体 pUC118 中，再利用 PCR 的方法将其 f2 上的 *StuI* 酶切位点突变，以便
于 f1 能够克隆进去，接着更换载体为 pCB301，继而将 f1 片段也克隆进去，获得
pCB301-FoMV。此过程中所涉及到的阳性重组质粒均选取三个对应菌液委托上海英骏公司
进行测序。完整的 pCB301-FoMV 重组质粒构建示意图如下图 1 所示：



110 图 1 FoMV 侵染性克隆质粒构建示意图
Fig. 1 Structure diagram of infectious plasmid of FoMV

所用引物序列如下表 1 所示：

表 1 FoMV 侵染性克隆所用引物设计
Table 1 The primers of infectious clone in this thises

| Primers | Nucleotide sequence (5'-3') | Positions |
|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------|
| FoMV <i>Stu</i> I F | 5' GAAAGACTCTTCGAAACCGA 3' | 5' end of ToMV |
| FoMVfIR3830 | 5' CATGGGATCCTTGAGGTAGC 3' | nt3811-3830 of FoMV |
| FoMVf2F3804 | 5' CCACGGGGCTACCTCAAG 3' | nt3804-3821 of FoMV |
| FoMVR | 5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATAAGC 3' | 3' end FoMV |
| FoMVR5526 <i>Stu</i> I | 5' CTCGCTTCTGCGCCG 3' | 5526nt |
| FoMVcp ProIR | 5' CGACGCGTACTAGTCTTGT | nt5383-5416 of FoMV |
| 5416- <i>Mlu</i> I <i>Spe</i> I | AGTCCGTCGCATCAG 3' | |
| FoMVcp Pro II F | 5' CGACGCGTGGGCCCTCTAGAA | nt5228-5267 of FoMV |
| 5228- <i>Mlu</i> I <i>Apa</i> I <i>Xba</i> I | TGTCGAAATCAACGGCCAC 3' | |
| FoMVcp Pro II R5670 | 5' CCAGCATCTTTGCAAGCTAGC 3' | nt5650-5670 of FoMV |

注：“F”代表上游引物，“R”代表下游引物

“F” means up forward primer, “R” means reverse primer

1.2.2 FoMV 农杆菌侵染性克隆构建与浸润接种

经过四个克隆构建环节后，将最终确定的两个 pCB301-FoMV 完整重组质粒 NO.5 和 NO.9 电转化至农杆菌 GV3101，浸润接种至 6 叶期的本氏烟和 2 片真叶期的四种大麦 (*H. vulgare* Golden Promise, Ingrid, Movex, Pallas)，每组接种本氏烟 4~6 棵，大麦 10~16 棵，接种后用塑料薄膜遮盖保湿处理 24 小时后置于 25℃，16 小时光照培养，观察症状；待本氏烟出现症状后，采集其新鲜叶片通过摩擦接种的方式转接至新的大麦植株上，所有实验组均以含 pCB301 空载体农杆菌浸润接种植株作为空白对照，注射后观察寄主症状。

1.2.3 病毒活性验证

pCB301-FoMV 浸润接种本氏烟、大麦，摩擦转接大麦后，每天详细观察植物长势及是否出现明显症状，并在 7dpi & 12dpi 后连续抽提寄主的总 RNA，通过 TBE 电泳及 RT-PCR 方法分别检测植株是否受病毒感染，以确定病毒是否具有侵染活性。

1.2.4 含有多克隆位点的 VIGS 载体构建

上节中成功构建了 FoMV 的农杆菌侵染性克隆, 并验证了其在本氏烟和单子叶植物大
麦上具有侵染活性, 将其命名为 pFoMV-wt。本节主要是以 pFoMV-wt 为基础, 经过双酶切、
PCR 扩增引入酶切位点、连接和转化等实验室常规方法构建含有 2 个 FoMV CP 亚基因组启
动子的 FoMV 克隆, 这 2 个 CP 亚基因组启动子相邻正向直接重复, 在 2 个 CP 亚基因组启
动子中间引入多个酶切位点, 酶切位点下游含有完整的 CP 基因及其启动子, 在该克隆中被
重复的片段是 5228nt-5416nt, 获得的重组质粒为含有多克隆位点的基因沉默候选载体
pFoMV-VIGS。

1.2.5 pFoMV-GFP 及 pFoMV-PDS 的构建

在上节所构建的 pFoMV-VIGS 中, 其 2 个 CP 亚基因组启动子中间已引入了酶切位点 (*MluI*/*SpeI*/*ApaI*/*XbaI*), 因此选择 pFoMV-VIGS 的阳性克隆作为基础载体; 提取大麦 (*H. vulgare* *Movex*) 的总 RNA 作为模板利用 RT-PCR 获得对应的 cDNA, 即大麦内源 PDS 基因, 继而将其与绿色荧光蛋白 GFP ORF 分别克隆到 pFoMV-VIGS 载体中, 构建出两种侵染性克隆载体 pFoMV-GFP、pFoMV-PDS。

至此所构建的重组病毒分别为:

- a) pFoMV-wt: 1-6189
b) pFoMV-VIGS: (1-5416)-(M_{ul}I/ S_{pe}I/A_{pa}I/X_{ba}I)-(5228-6189)

c) pFoMV-GFP: (1-5416)-(GFP gene)-(5228-6189)

d) pFoMV-PDS: (1-5416)-(PDS gene)-(5228-6189)

1.2.6 瞬时表达-农杆菌共浸润及病毒活性检测

对以上所构建的三组重组质粒 pFoMV-VIGS、pFoMV-GFP、pFoMV-PDS, 进行农杆菌转化和鉴定后, 通过浸润接种至本氏烟, 继而将其摩擦转接至大麦上, 每天详细观察植物长势及是否出现明显症状, 并在 7dpi & 12dpi 后抽提各寄主的总 RNA, 通过 TBE 电泳检测方法以及 RT-PCR 分别连续检测植株是否受病毒感染, 以确定病毒是否具有侵染活性。

2 结果与分析

2.1 FoMV 农杆菌侵染性克隆构建与活性分析

选取 pFoMV-NO.5 和 pFoMV-NO.9 阳性重组质粒电转化至农杆菌 GV3101, PCR 鉴定后浸润接种本氏烟和单子叶植物大麦 (*H. vulgare* Golden Promise, Ingrid, Movex, Pallas), 观察并及时拍摄记录寄主表型反应, 并提取寄主总 RNA, 利用 TBE 电泳及其 RT-PCR 方法对其病毒活性进行分子水平的检测和验证。

2.1.1 本氏烟上的活性分析

1) pFoMV-wt 之 NO.5 和 NO.9 在本氏烟上的表型分析

NO.5 和 NO.9 浸染接种本氏烟 7 天后, 植物非接种叶片出现退绿和轻微花叶症状, 作为对照组的本氏烟 Mock 生长状况良好, 未出现类似症状 (图 2)。由此可初步推断本研究

所构建的 FoMV 农杆菌侵染性克隆 NO.5 和 NO.9 均具有侵染活性。

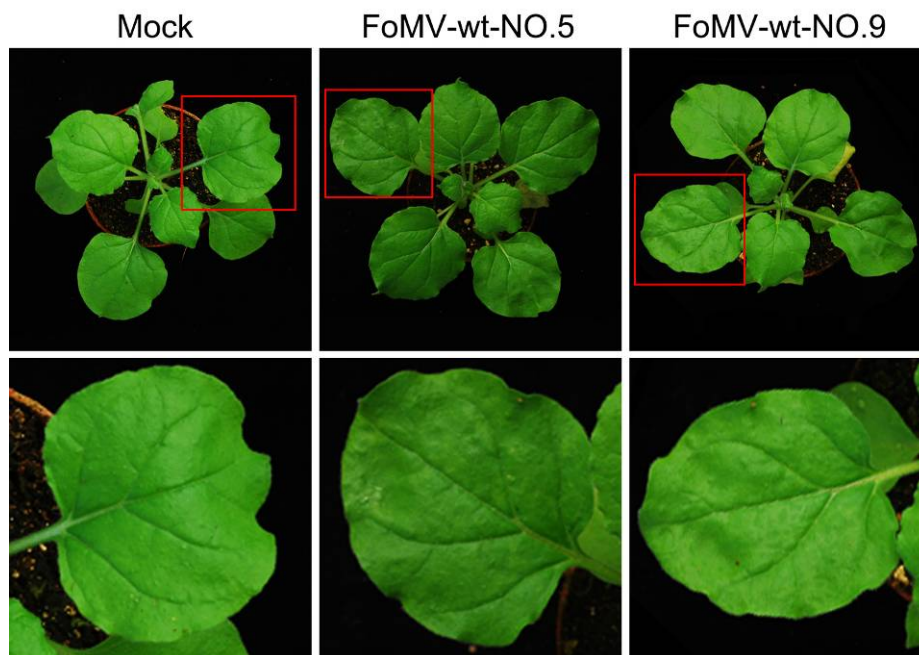


图 2 pFoMV-wt 之 NO.5 和 NO.9 接种本氏烟 7 天后症状
Fig. 2 Symptoms induced on *N. benthamiana* infected by pFoMV-wt-NO.5 and pFoMV-wt-NO.9 at 7dpi

2) pFoMV-wt 之 NO.5 和 NO.9 在本氏烟上分子检测结果与分析:

分别从接种有 pFoMV-wt 之 NO.5 和 NO.9 侵染性克隆 7 天后的本氏烟上采取非接种叶, 提取其总 RNA, 进行 TBE 电泳检测 (图 3 A) 和 RT-PCR 验证 (图 3 B)。RNA 电泳结果显示: 在接种 pFoMV-wt 之 NO.5 和 NO.9 的本氏烟总 RNA 中均可看到明显的病毒条带;

RT-PCR 结果也同样扩增出了对应的目的条带，结果与 TBE 电泳结果相符；由此可进一步
175 确定本研究所构建的 FoMV 农杆菌侵染性克隆 NO.5 和 NO.9 均具有侵染活性，与观察本氏
烟表型所得出的结论一致，将 NO.5 正式命名为 pFoMV-wt。

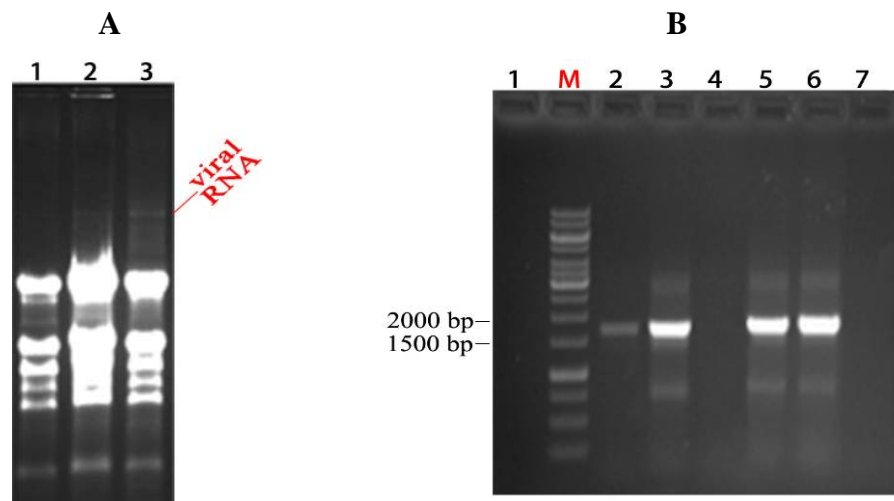


图3 pFoMV-wt 之 NO.5 和 NO.9 在本氏烟上的分子检测
Fig. 3 Molecular detection of pFoMV-wt-NO.5 and pFoMV-wt-NO.9
on *N. benthamiana*

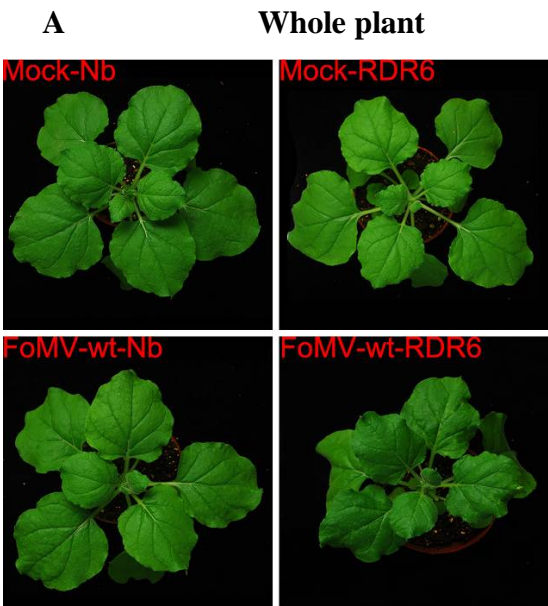
A pFoMV-wt 之 NO.5 和 NO.9 接种本氏烟后总 RNA 提取
A The total RNA of *N. benthamiana* infected by pFoMV-wt-NO.5 and pFoMV-wt-NO.9
1: Mock; 2: pFoMV-wt-NO.5; 3: pFoMV-wt-NO.9

B RT-PCR 检测结果
B Detection results of the total RNA after RT-PCR
1: 阴性; 2: PCR 阳性; 3: RT 阳性; 4: Mock; 5: pFoMV-wt-NO.5; 6: pFoMV-wt-NO.9
1:negative; 2:PCR positive; 3:RT positive; 4:Mock; 5:pFoMV-wt-NO.5; 6:pFoMV-wt-NO.9

2.1.2 本氏烟和 RDR6 上的活性分析

1) pFoMV-wt 在本氏烟和转基因本氏烟 RDR6 上的表型分析:

pFoMV-wt 同时浸润接种本氏烟和转基因本氏烟 RDR6，7 天后，被接种植物上部分叶片均表现出退绿和轻微花叶症状，同之前侵染本氏烟产生的反应一致，但 RDR6 较本氏烟症状更为严重（图 4）。



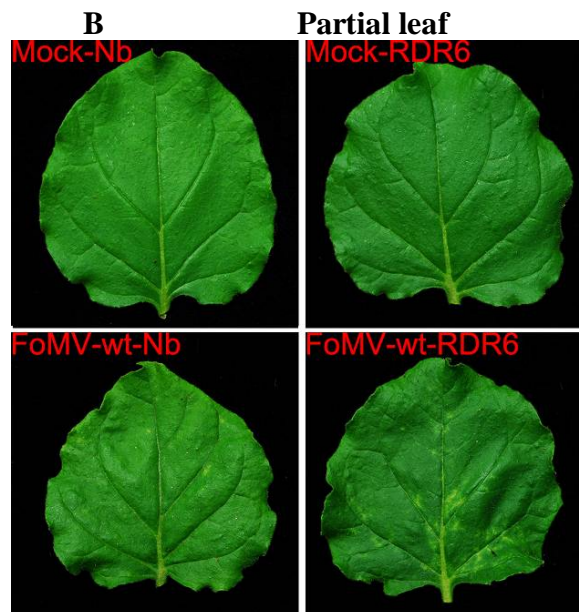


图 4 pFoMV-wt 接种本氏烟和 RDR6 7 天后症状
Fig. 4 Symptoms induced on *N. benthamiana* and RDR6 infected by pFoMV-wt at 7dpi

2) pFoMV-wt 在本氏烟和 RDR6 上分子检测结果与分析

分别从接种有 pFoMV-wt 侵染性克隆 7 天后的本氏烟和 RDR6 上采取非接种叶, 提取其总 RNA, 进行 TBE 电泳检测和 RT-PCR 验证。RNA 电泳结果显示: 等量 RNA 进行电泳, RDR6 中病毒条带显著亮于本氏烟中病毒条带; RT-PCR 结果也同样验证了这一结论; 这与我们通过其在本氏烟和 RDR6 上的表型所得出的结论相一致。

2.1.3 大麦上的活性分析

1) pFoMV-wt 在四种大麦上的表型分析:

种植四个品种的大麦 (*H. vulgare* *Golden Promise*, *Ingrid*, *Movex*, *Pallas*), 分别用 pFoMV-wt 浸润接种和采取鲜嫩且感病的本氏烟叶片对四种大麦进行摩擦接种, 12 天后, 对照组四种 Mock 生长状况均良好, 无任何病症表现; 在浸润注射接种组内, 四种大麦生长状况亦良好, 跟 Mock 组无差别; 而在摩擦接种组内, 除品种 *Golden Promise* 之外, 其余植株叶片均出现退绿现象, 表现出枯黄花叶症状 (图 5)。由此可初步推断所构建的 FoMV 农杆菌侵染性克隆对于大麦具有侵染活性, 但同时说明对于 *Golden Promise* 品种的大麦不能被 pFoMV-wt 所侵染, 且此病毒在农杆菌 GV3101 的介导下较为适合采用摩擦接种的方式侵染大麦。

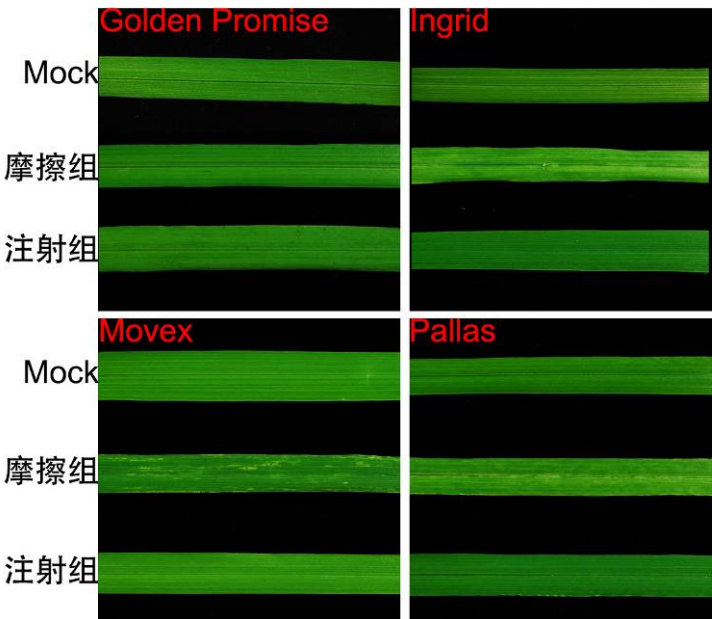


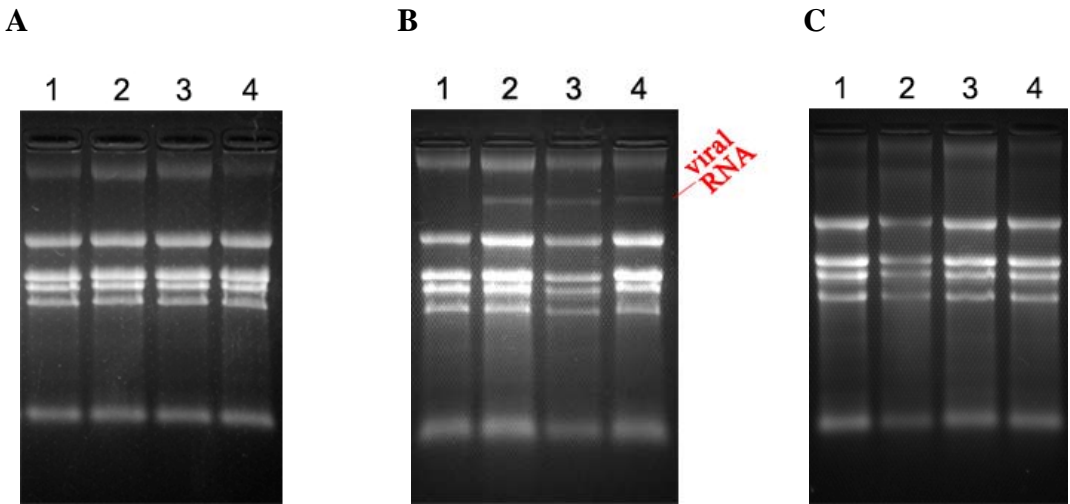
图 5 pFoMV-wt 摩擦接种和注射接种大麦（*Golden Promise*, *Ingrid*, *Movex*, *Pallas*）12 天后症状

Fig. 5 Symptoms induced on four variety of barley infected by pFoMV-wt at 12dpi via mechanically inoculated and agroinfection

2) 大麦上病毒的分子检测结果与分析

pFoMV-wt 在大麦（*H. vulgare Golden Promise*, *Ingrid*, *Movex*, *Pallas*）上的分子检测结果与分析：

分别从浸润接种和摩擦接种有 pFoMV-wt 侵染性克隆 12 天后的四种大麦上采取非接种叶，提取其总 RNA，进行 TBE 电泳检测（图 6 A-C）和 RT-PCR 验证（图 6 D）。RNA 电泳结果显示：在浸润接种组内，四种大麦总 RNA 中均无明显病毒条带，与四种 Mock 无差异，而在摩擦接种组内，除 *Golden Promise* 之外其他三个品种（*H. vulgare Ingrid*, *Movex*, *Pallas*）的大麦总 RNA 中均可看到明显的病毒条带；RT-PCR 结果也同样扩增出了相应的目的条带，结果与 TBE 电泳结果相符；由此可进一步确定本研究所构建的 FoMV 农杆菌侵染性克隆在单子叶植物大麦上具有侵染活性，且与我们通过其在四种大麦上的表型所得出的结论相一致。



240

D

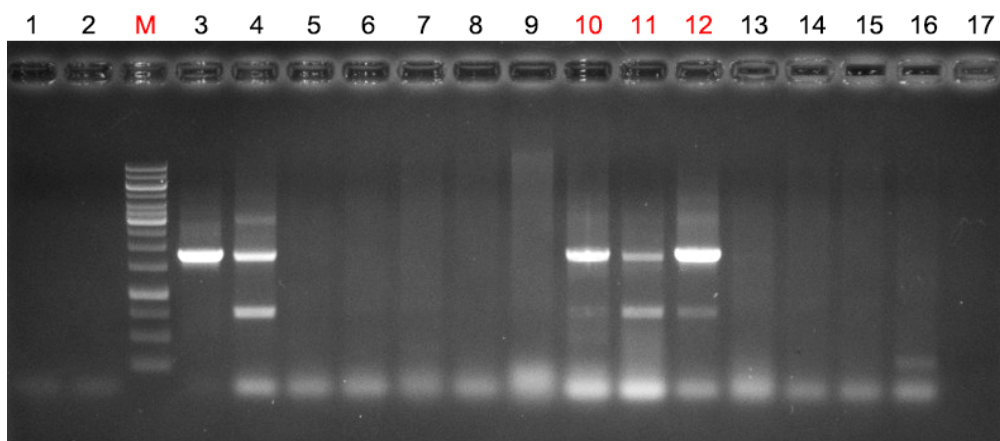


图 6 pFoMV-wt 在大麦上的分子检测

Fig. 6 Molecular detection of pFoMV-wt on four variety of barley

A 四种大麦的 Mock 总 RNA 电泳

1: *Golden Promise*; 2: *Ingrid*; 3: *Movex*; 4: *Pallas*

B 四种大麦的摩擦接种组总 RNA 电泳

1: *Golden Promise*; 2: *Ingrid*; 3: *Movex*; 4: *Pallas*

C 四种大麦的浸润接种组总 RNA 电泳

1: *Golden Promise*; 2: *Ingrid*; 3: *Movex*; 4: *Pallas*

D RT-PCR 检测结果

1: PCR 阴性; 2: RT 阴性; M: 1kb Marker; 3: PCR 阳性; 4: RT 阳性; 5-8: Mock (*H. vulgare Golden Promise, Ingrid, Movex, Pallas*); 9: 摩擦接种 (*H. vulgare Golden Promise*); 10-12: 摩擦接种 (*H. vulgare Ingrid, Movex, Pallas*); 13-16: 注射接种 (*H. vulgare Golden Promise, Ingrid, Movex, Pallas*)

245

250

2.2 pFoMV-VIGS、pFoMV-PDS、pFoMV-GFP 的寄主生物学表型与分析

选择 pFoMV-VIGS、pFoMV-PDS、pFoMV-GFP 三个阳性重组质粒电转化至农杆菌 GV3101, 并同时活化 pFoMV-wt, 经过 PCR 鉴定后浸润接种本氏烟, 5dpi 后摘取接种叶摩擦转接至大麦 (*H. vulgare Movex*), 调节浓度至 $OD_{600}=1.0$, 选取 6 叶期的本氏烟和 2 叶期的大麦, 每组浸润接种本氏烟 4~6 棵, 大麦 3~4 盆, 每盆种植有 3~5 棵大麦, 接种后放置于 25℃, 光照周期 16h 环境培养, 观察并及时拍摄记录寄主植物症状, 亦采用 RNA 提取, 电泳检测及其 RT-PCR 验证方法对其病毒活性进行分子水平的分析。

260

2.2.1 本氏烟上的活性分析

1) 本氏烟上的表型分析

pFoMV-wt、pFoMV-VIGS、pFoMV-PDS、pFoMV-GFP 浸染接种本氏烟 7dpi 后, 对照组的 Mock 生长状况良好, pFoMV-wt 组植物非接种叶片出现退绿和轻微的花叶症状, 跟上节结果一样, 而在跟踪观察 15dpi 期间, pFoMV-VIGS、pFoMV-PDS、pFoMV-GFP 组均未出现类似症状, 生长状况始终同 Mock 组保持一致 (图 7)。由此初步推断本研究所构建的 pFoMV-VIGS、pFoMV-PDS、pFoMV-GFP 农杆菌侵染性克隆在本氏烟失去了侵染活性。

265

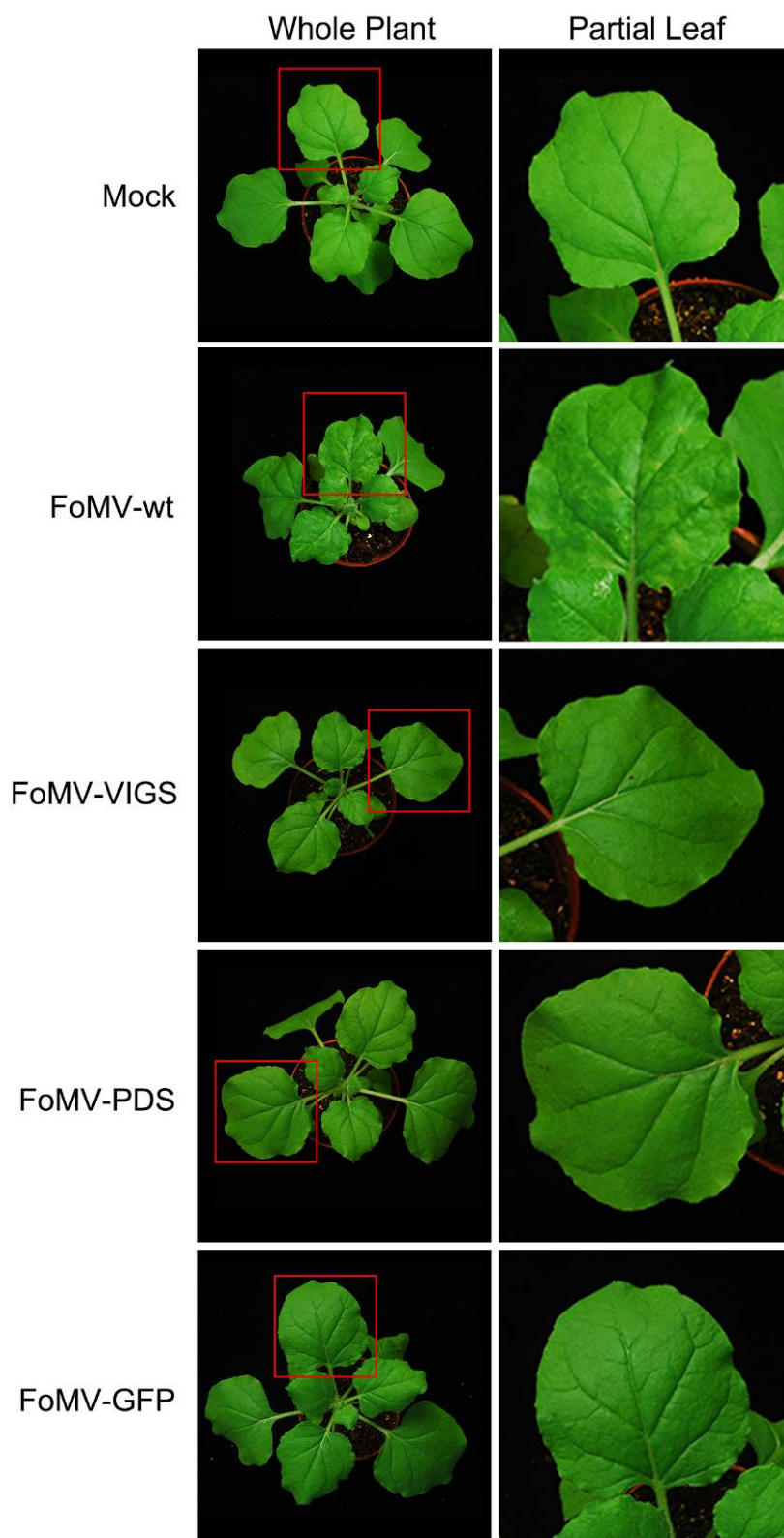


图 7 pFoMV-wt、pFoMV-VIGS、pFoMV-PDS、pFoMV-GFP 接种本氏烟 7 天后症状

Fig. 7 Symptoms induced on *N. benthamiana* infected by pFoMV-wt、pFoMV-VIGS、pFoMV-PDS、pFoMV-GFP at 7dpi

2) 本氏烟上的分子检测结果与分析

分别从接种有 pFoMV-wt、pFoMV-VIGS、pFoMV-PDS 和 pFoMV-GFP 侵染性克隆 7dpi

的本氏烟上采取非接种叶，提取总 RNA，进行 TBE 电泳检测（图 8 A）和 RT-PCR 验证（图 8 B）。RNA 电泳结果显示：在接种有 pFoMV-wt 的本氏烟总 RNA 中可看到明显的病毒条带，而接种有 pFoMV-VIGS、pFoMV-PDS 和 pFoMV-GFP 的本氏烟中均看不到病毒条带，在随后的 8dpi 和 13dpi 反复检测，结果均一致；RT-PCR 结果中，pFoMV-wt 扩增出了对应的目的条带，而 pFoMV-VIGS、pFoMV-PDS 和 pFoMV-GFP 均未扩增出目的条带，这也与 TBE 电泳结果相对应；由此可进一步确定本研究所构建的 pFoMV-VIGS、pFoMV-PDS、pFoMV-GFP 农杆菌侵染性克隆在本氏烟上失去了侵染活性，与我们通过其在本氏烟上的表型所得出的结论相一致，但导致这一结果的原因和分子机制还不清楚，有待研究。

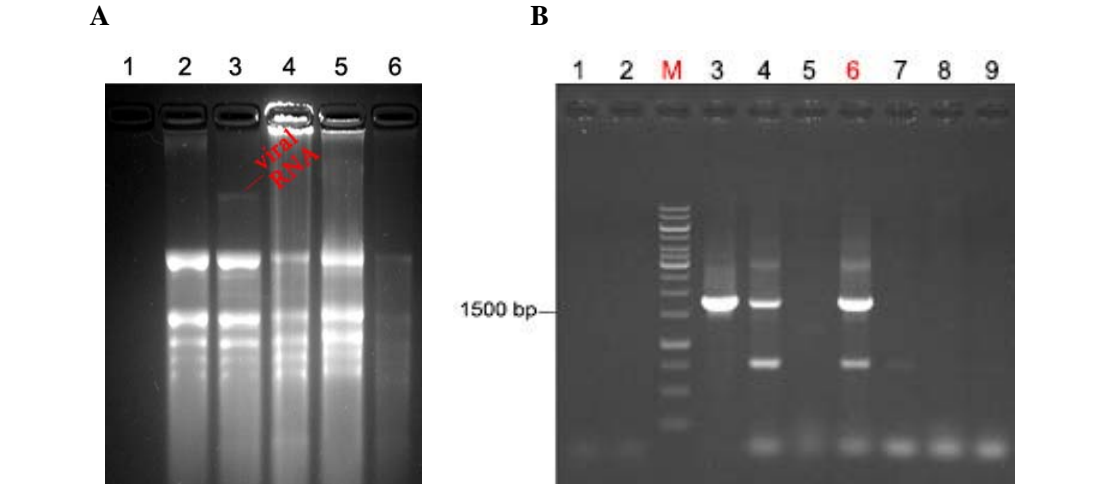


图 8 pCB301-FoMV-wt、pCB301-FoMV-VIGS、pCB301-FoMV-PDS、pCB301-FoMV-GFP 在本氏烟上的分子检测

Fig. 8 Molecular detection of pCB301-FoMV-wt、pCB301-FoMV-VIGS、pCB301-FoMV-PDS pCB301-FoMV-GFP on *N. benthamiana*

A pCB301-FoMV-wt、pCB301-FoMV-VIGS、pCB301-FoMV-PDS、pCB301-FoMV-GFP 接种本氏烟后总 RNA 提取

A Electrophoresis result of total RNA of *N. benthamiana* infected by pCB301-FoMV-wt、pCB301-FoMV-VIGS、pCB301-FoMV-PDS、pCB301-FoMV-GFP

1: Mock; 2: pCB301-FoMV-wt; 3: pCB301-FoMV-VIGS; 4: pCB301-FoMV-PDS; 5: pCB301-FoMV-GFP

B RT-PCR 检测结果

B The detection result of RT-PCR

1-2: 阴性对照 M: 1kb Marker; 3: PCR 阳性 4: RT-PCR 阳性; 5: Mock; 6: pCB301-FoMV-wt; 7: pCB301-FoMV-VIGS; 8: pCB301-FoMV-PDS; 9: pCB301-FoMV-GFP

2.2.2 大麦上的活性分析

1) 大麦上的表型分析

在上小节中我们得出结论，四个品种的大麦（*H. vulgare* Golden Promise, Ingrid Movex, Pallas）中，有三种可被 pFoMV-wt 所侵染，在此我们直接选择 *Movex* 作为寄主。采取已接种有 pFoMV-wt、pFoMV-VIGS、pFoMV-PDS 和 pFoMV-GFP 4dpi 的本氏烟接种叶对大麦 *Movex* 进行摩擦接种，跟踪观察及拍照；12 天后，对照组 Mock 生长良好，无任何病症表现；pFoMV-wt 组植物整株叶片出现退绿现象，表现出轻微的花叶症状，跟之前所得结果一样，pFoMV-VIGS、pFoMV-PDS、pFoMV-GFP 三个实验组均出现类似症状，始终同对照组的 pFoMV-wt 保持相当（图 9）。由此可初步推断本研究所构建的 pFoMV-VIGS、pFoMV-PDS、pFoMV-GFP 农杆菌侵染性克隆能够侵染单子叶植物大麦。

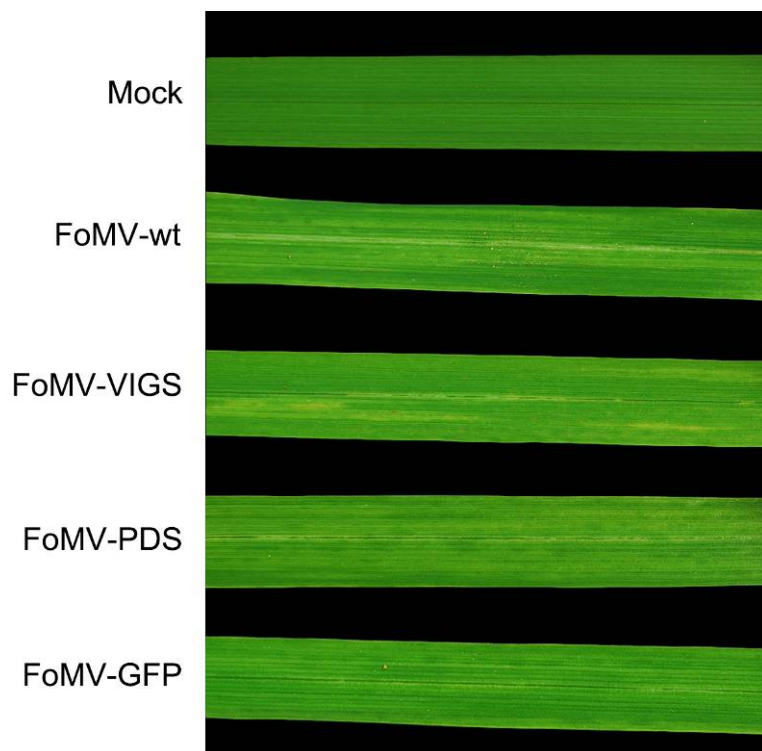


图9 pFoMV-wt、pFoMV-VIGS、pFoMV-PDS、pFoMV-GFP
摩擦接种大麦 (*H. vulgare* Movex) 12 天后症状

Fig. 9 Symptoms induced on *H. vulgare* infected by
pFoMV-wt、pFoMV-VIGS、pFoMV-PDS、pFoMV-GFP at 12dpi

2) 大麦上的分子检测结果与分析

采取摩擦接种有 pFoMV-wt、pFoMV-VIGS、pFoMV-PDS 和 pFoMV-GFP 的大麦 (*H. vulgare* Movex) 12 天后的新鲜叶片, 提取总 RNA, 进行 TBE 电泳检测 (图 10 A) 和 RT-PCR 验证 (图 10 B)。RNA 电泳结果显示: 对照组 Mock 无污染, 在接种有 pFoMV-wt、pFoMV-VIGS、pFoMV-PDS 和 pFoMV-GFP 的大麦 (*H. vulgare* Movex) 的总 RNA 中均能看到明显病毒条带; RT-PCR 结果表明: pFoMV-wt 组的 RNA 可扩增出目的条带, 与之前结论相符, 但 pFoMV-VIGS、pFoMV-PDS 和 pFoMV-GFP 也同样扩增出了同 pFoMV-wt 一样大小的条带, 理论上应该扩增出比 pFoMV-wt 组大约 700bp 左右的片段, 反复检测, 结果均一致; 根据这一结果本研究推测所构建的 pFoMV-VIGS、pFoMV-PDS、pFoMV-GFP 农杆菌侵染性克隆在大麦上可能发生了基因重组, 使复制过程中对外源基因产生排斥, 只复制出其原本的野生型 pFoMV-wt 全序列, 导致我们观察到的寄主症状均类似于 pFoMV-wt, 在 RT-PCR 中也只能扩增出同 pFoMV-wt 一样大小的片段。

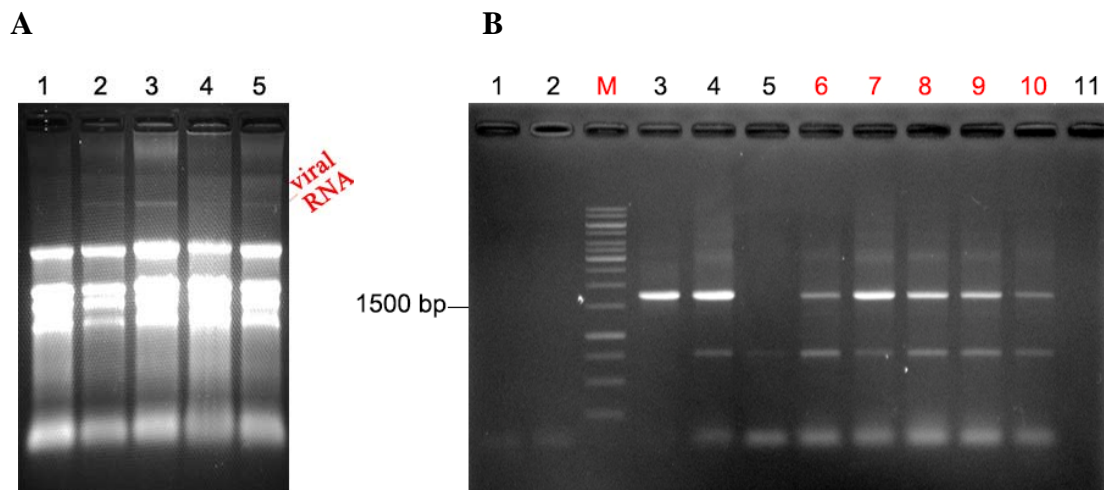


图 10 pFoMV-wt、pFoMV-VIGS、pFoMV-PDS、pFoMV-GFP

在大麦 (*H. vulgare Movex*) 上的分子检测

Fig. 10 Molecular detection of pFoMV-wt、pFoMV-VIGS、pFoMV-PDS、pFoMV-GFP on *H. vulgare Movex*

A pFoMV-wt、pFoMV-VIGS、pFoMV-PDS、pFoMV-GFP

接种大麦后总 RNA 提取

1: Mock; 2: pFoMV-wt; 3: pFoMV-VIGS; 4: pFoMV-PDS; 5: pFoMV-GFP

A Electrophoresis result of total RNA of *H. Vulgare Movex* infected by pFoMV-wt, pFoMV-VIGS, pFoMV-PDS, pFoMV-GFP

B RT-PCR 检测结果

B The detection result of RT-PCR

1-2: 阴性对照 M: 1kb Marker; 3: PCR 阳性 4: RT-PCR 阳性; 5: Mock; 6: pFoMV-wt;

7: pFoMV-VIGS; 8: pFoMV-PDS; 9-10: pFoMV-GFP

3 总结与讨论

根据目前国内外研究, 大多数植物病毒的侵染性克隆是通过体外转录的方法来实现的, 但该方法操作过程繁琐, 容易降解, 条件严格且成本高, 不适合大规模进行遗传和基因突变等操作。本研究以浸润接种为基础, 成功构建了基于 FoMV 的由农杆菌介导的侵染性克隆, 能够成功侵染大麦并引起轻微花叶和线条式退绿症状; 其次在此载体的基础上进行改造, 构建了含有多克隆位点的 FoMV VIGS 载体以及含有大麦 (*H. vulgare Movex*) 内源 PDS 基因以及绿色荧光蛋白 GFP ORF 的克隆载体 pFoMV-PDS、pFoMV-GFP。通过浸润接种和摩擦转接的方式接种本氏烟 (*N. benthamiana*) 和大麦 (*H. vulgare Movex*), 观察寄主表型, 对病毒进行分子水平的验证, 以研究其侵染活性和外源基因的表达。相信这一系列研究对于了解该病毒的基因组结构与功能提供了有用的实验根据, 有利于研究与水稻、玉米、小麦等在内的重要粮食作物以及其他作物生长发育、抗胁迫相关的功能基因, 也为加快水稻等单子叶植物功能基因组的研究提供一定的理论基础和技术铺垫。

在此就本研究所取得的成果和实验进程中所遇到的问题作一系统总结和讨论:

1) 成功构建了基于 FoMV 的农杆菌侵染性克隆 pFoMV-wt;

2) 在 pFoMV-wt 农杆菌侵染性克隆构建成功之前, 我们采用同样方法将 FoMV 全序列克隆到含有核酶 (ribozyme) 的载体 pCB301 中, 实验结果显示, 病毒在本氏烟上无活性。根据 FoMV 基因组结构分析等研究, 本文推测是由于载体中核酶的存在, 而导致病毒在植物体内的转录产物中的 Poly(A) 结构总是被自我剪切, 不能形成稳定的 cDNA 所造成的。最后我们将载体中的核酶去掉, 以同样方法重新构建, 证明后者在本氏烟上具有侵染活性。

3) 实验结果显示: 转基因本氏烟 RDR6 中的 FoMV 病毒含量始终高于普通本氏烟。

4) 对于本研究中的四种大麦 (*H. vulgare Golden Promise, Ingrid, Movex, Pallas*), 采用农杆菌注射接种的方法, 病毒均侵染失败。本文推测首先大麦属于禾本科植物, 其叶片窄而长且表面具有较厚角质, 不易采用农杆菌注射接种, 可能导致侵染失败; 其次有研究表明, 农杆菌介导的方法在单子叶植物上的侵染效率较低^[13]; 最后, 由于本研究只采用了 GV3101 菌株, 导致这种结果的原因也许跟所用农杆菌菌株类型有关系。

5) 品种为 *H. vulgare Golden Promise* 的大麦, 无论是浸润接种还是机械式摩擦接种, 此病毒始终不能成功侵染, 原因不明, 有待研究。但这侧面证明了病毒在植株上是否具有侵染活性不仅与接种方式有关, 也与被侵染植物本身的品种有关。

6) 所构建的 pFoMV-VIGS、pFoMV-PDS、pFoMV-GFP 三组重组病毒, 在本氏烟上无任何症状反应, 分子检测结果也表明侵染失败, 具体原因还有待研究, 但有文献报道^[14], 在同为马铃薯 X 病毒组的 BaMV 研究中也存在类似现象, 发现其复制酶之类解旋酶素和外鞘蛋白间有交互作用, 且发现外鞘蛋白上 A209G 及 N210S 氨基酸位置突变会减少与复制酶素的交互作用, 并限制病毒于烟草及白藜感染后的扩散, 因此我们推测此现象是否同样存在于 FoMV 侵染本氏烟中。

7) pFoMV-VIGS、pFoMV-PDS、pFoMV-GFP 摩擦接种至大麦 (*H. vulgare Movex*), 植株均表现出 pFoMV-wt 的野生型症状, 并未发生基因沉默效应和绿色荧光显现, 分子检测结果也表明只存在野生型 pFoMV-wt 病毒。究其原因, 本文推测, 首先病毒在植株体内可能发生基因重组, 原病毒序列对外源插入基因有排斥作用, 造成插入片段丢失, 接种后病毒只转录出本身的 cDNA, 导致改造的 FoMV 恢复成野生型病毒; 其次, 转基因所加入的外源基因片段的长度, 以及所插入外源基因的位置也有可能是导致其病毒诱导基因沉默没有出现的原因。第三有文献报道, 被含有大麦、大米或者玉米内源 PDS 基因的大麦条纹花叶病毒(*Barly Strip Mosaic Virus BSMV*)所侵染的大麦, 会发生光漂白或者是茄红素积累现象, 但被野生型的 BSMV 或者含有本氏烟 PDS 以及 GFP 所侵染的大麦则不会出现以上现象^[15]。这说明尽管目前农杆菌介导的单子叶植物遗传转化研究取得了较大进步, 但仍存在着基因型限制、转化率不高和外源基因表达活性低等问题。

8) 本文认为后续研究可从构建更多的基于 FoMV 的病毒介导的基因沉默克隆载体入手, 也可就该病毒的基因组功能和外源基因长度及插入位点, 所用农杆菌菌株类型等展开研究, 从而加快单子叶植物功能基因组的研究与发展。

[参考文献] (References)

- [1] Paulsen A, Niblett C. Purification and properties of foxtail mosaic virus [J]. *Phytopathology*, 1977, 67 (1): 346-341.
- [2] Bancroft J, Rouleau M, Johnston R, et al. The entire nucleotide sequence of foxtail mosaic virus RNA [J]. *The Journal of general virology*, 1991, 72 2173.
- [3] Seifers D L, Harvey T L, Haber S, et al. Natural infection of sorghum by foxtail mosaic virus in Kansas [J]. *Plant disease*, 1999, 83 (10): 905-912.
- [4] PAULSEN A Q. Reactions of eleven *Chenopodium* species to seven sap-transmissible grass viruses [J]. *Phytopathology*, 1970, 60 1307.
- [5] Robertson N, French R, Morris T J. The open reading frame 5A of foxtail mosaic virus is expressed in vivo and is dispensable for systemic infection [J]. *Archives of virology*, 2000, 145 (8): 1685-1698.
- [6] Bendena W G, Mackie G A. Translational strategies in potexviruses: Products encoded by clover yellow mosaic virus, foxtail mosaic virus, and viola mottle virus RNAs in vitro[J]. *Virology*, 1986, 153 (2): 220-229.
- [7] Richardson J, Tollin P, Bancroft J. The architecture of the potexviruses [J]. *Virology*, 1981, 112 (1): 34-39.
- [8] Bruun-Rasmussen M, Madsen C T, Johansen E, et al. Revised sequence of foxtail mosaic virus reveals a triple gene block structure similar to potato virus X [J]. *Archives of virology*, 2008, 153 (1): 223-226.
- [9] Liu Z, Kearney C. An efficient Foxtail mosaic virus vector system with reduced environmental risk [J]. *BMC Biotechnol*, 2010, 10 (1): 88.

- [10] Hsing Y-I, Chern C-G, Fan M-J, et al. A rice gene activation/knockout mutant resource for high throughput functional genomics [J]. Plant molecular biology, 2007, 63 (3): 351-364.
- 425 [11] 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.
- [12] Cai X-Z, Xu Q-F, Wang C-C, et al. Development of a virus-induced gene-silencing system for functional analysis of the RPS2-dependent resistance signalling pathways in Arabidopsis [J]. Plant molecular biology, 2006, 62 (1-2): 223-232.
- 430 [13] 魏开发, 刘逸萍, 林子英, et al. 农杆菌介导单子叶植物遗传转化问题与对策 [J]. 植物学通报, 2008, 25 (4): 491-496.
- [14] 王政承. 狐尾草嵌纹病毒核酸复制酶之解旋酶区与外鞘蛋白质之交互作用会影响病毒在细胞间的移动 [D]. 中国台湾:国立中兴大学生物科技学研究所学位论文, 2012.
- 435 [15] Holzberg S, Brosio P, Gross C, et al. Barley stripe mosaic virus - induced gene silencing in a monocot plant [J]. The Plant Journal, 2002, 30 (3): 315-327.