利用 BSMV Agro/LIC 进行小麦条锈菌耐高温相关基因功能分析的互作体系构建

吴艳琴[1]， 王金鑫[1]， 李 雪[1]， 高海峰[2]，
王凤涛[1]， 冯 晶[1]， 蔺瑞明[1*]， 徐世昌[1]

(1. 中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193；
2. 新疆农业科学院植物保护研究所，乌鲁木齐 830091)

摘要 为利用 HIGS 技术研究条锈菌耐高温胁迫相关基因的功能，需要构建小麦品种与条锈菌及大麦条纹花叶病毒 *Barley stripe mosaic virus* (BSMV)亲和互作体系。本研究选用 20 个常温下(10℃)高感条锈病的小麦品种和 22 个耐高温条锈菌菌株，进行高温(21℃)条件下接种亲和性分析，发现 11 个品种高感条锈病、3 个菌株耐高温性稳定且毒性谱较宽。在此基础上，利用含有小麦 *TaPDS* 基因片段的重组 BSMV 侵染上述候选小麦品种，确定'Local Red'等 6 个品种与 BSMV 亲和程度符合试验要求。筛选出小麦品种'Local Red'与菌株 15335-2、15323-4 等组成的最佳互作组合，适合利用 BSMV Agro/LIC 方法开展小麦条锈菌耐高温相关基因功能的研究。

关键词 小麦条锈病； 基因干涉； 大麦条纹花叶病毒； 耐高温性； 互作体系

中图分类号： S435.121.42，Q933 **文献标识码：** A **DOI：** 10.16688/j.zwbh.2017103

Development of an interactive system for functional analysis of high-temperature tolerance-related genes of wheat stripe rust pathogen by using BSMV Agro/LIC

WU Yanqin[1]， WANG Jinxin[1]， LI Xue[1]， GAO Haifeng[2]，
WANG Fengtao[1]， FENG Jing[1]， LIN Ruiming[1]， XU Shichang[1]

(1. *State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests*，*Institute of Plant Protection*，*Chinese Academy of Agricultural Sciences*，*Beijing* 100193，*China*；2. *Institute of Plant Protection*，*Xinjiang Academy of Agricultural Sciences*，*Urumqi* 830091，*China*)

Abstract In order to characterize the biological functions of the high-temperature tolerance-related genes of *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* (*Pst*) by using HIGS method, it is necessary to develop a compatible interactive system containing wheat variety and *Pst* pathogen and *Barley stripe mosaic virus* (BSMV). In this study, 20 varieties (highly susceptible when inoculated at 10℃) were inoculated with 22 high-temperature-tolerant isolates at 21℃ and their compatibility levels were evaluated, and we found 11 highly susceptible varieties among the tested ones and 3 isolates with a highly stable level of high-temperature tolerance and a wider virulence spectrum. Based on the results, 6 varieties such as 'Local Red' were compatible with the BSMV strain containing a *TaPDS* fragment. Therefore, the combinations of the variety 'Local Red' with the isolates like 15335-2 and 15323-4 were the best interactive systems for characterizing high temperature-tolerance-related genes of *Pst* with BSMV Agro/LIC.

Key words wheat stripe rust； gene interference； *Barley stripe mosaic virus*； high-temperature tolerance； interactive system

条锈病是小麦上重要的气传叶部病害之一，在中国曾发生 4 次大规模暴发流行，造成小麦严重减产[1]。该病害在其他小麦生产国也造成危害，严重威胁着世界粮食安全供给。一般而言，小麦条锈病

收稿日期： 2017-03-24 **修订日期：** 2017-04-27
基金项目： 国家重点基础研究发展计划("973"计划)(2013CB127700)；国家重点研发计划(2016YFD0100102)；植物病虫害生物学国家重点实验室开放基金(SKLOF201509)；农业部作物种质资源保护与利用专项(2017NWB036-12)
* 通信作者 E-mail：linruiming@caas.cn

属于低温真菌病害，冷凉潮湿的环境条件适宜病原菌夏孢子萌发和侵染[2]。然而近年来在小麦条锈菌越夏区调查发现，条锈菌越夏海拔下限呈逐渐下降趋势，如在云南、川西北和甘肃陇南等地越夏海拔下降 50～ 300 m[3]。随着全球气候变暖，在其他国家和地区也出现小麦条锈菌耐受高温胁迫能力增强的现象，如 Milus 等发现美国 2000 年后新出现的菌株比 2000 年以前出现的菌株更适应高温环境且具有更强的侵染力[4]。Hovmøller 等发现 2000 年之后出现的 2 个侵染性更强且适应高温胁迫的条锈菌菌株在不到 3 年的时间里在北美、澳大利亚以及欧洲范围内快速传播[5]。因此，小麦条锈菌耐高温性是世界性问题，将对病害发生流行、病原菌的毒性变异、寄主抗性调控以及防控策略制定等产生深远影响。然而，由于小麦条锈菌是专性寄生真菌且侵染周期长，目前还缺乏遗传转化的技术途径，急需建立一个条锈菌基因功能分析的技术体系，促进小麦条锈菌与寄主互作过程中基因功能的研究进程。近年来，基于病毒诱导的基因沉默（virus induced gene silencing，VIGS）发展起来的寄主诱导的基因沉默（host induced gene silencing，HIGS）技术，利用 RNAi 基因干涉原理直接针对病原真菌基因，可以通过吸器等特殊结构进入病原菌细胞内沉默目的基因，明确专性寄生真菌的基因功能。Yin 等利用大麦条纹花叶病毒 *Barley stripe mosaic virus*（BSMV）介导的 HIGS 方法，首先实现了针对小麦条锈菌的相关基因的研究[6]。然而，目前适合单子叶植物的病毒载体只有雀麦花叶病毒 *Brome mosaic virus*（BMV）与 BSMV，且对小麦宿主的基因沉默效果比较稳定的只有 BSMV 载体[7-8]。因而，选用已有的 BSMV 载体，构建适合研究条锈菌耐高温相关基因功能的技术体系尤为重要。在此技术体系中，不仅要获得耐高温性稳定且毒性较强的条锈菌菌株，还需要筛选获得相应的不具有温敏抗性的高感条锈病品种，同时适合 BSMV 侵染后产生温和的亲和反应型。另外，选择的小麦品种在苗期至成株期的不同发育阶段在高温条件下都是高感条锈病。

本研究从已获得的 22 个耐高温菌株中进一步筛选适合于利用 HIGS 技术研究耐高温相关基因功能研究的菌株；从常温下对所有菌株都表现为高度感病（侵染型 4 型，严重度 100%）的 20 个品种中筛选出高温条件下以及不同叶龄时期均具有高感病表型的品种。结合 BSMV 侵染情况，构建利用 HIGS 技术研究条锈菌耐高温相关基因功能的互作技术体系。

1 材料与方法

1.1 材料

供试条锈菌菌株：选用 2013 年－2016 年鉴定筛选获得的 22 个来源于不同省份的耐高温小麦条锈菌菌株（表 1）。

表 1 供试小麦条锈菌耐高温菌株

Table 1 Wheat stripe rust isolates with high－temperature tolerance

菌株编号 Isolate number	采集地点 Sample location	采集时间/年-月-日 Collection date
15463	青海省湟中县鲁沙尔镇朱家庄	2015－07－30
P4－3－6	四川省成都市郫县	2013－05－02
14006－3	湖北省襄樊市老河口市李楼镇陈埠村	2014－04－12
14011－1	湖北省襄阳市南漳县清河区雷家巷村	2014－04－12
15454－1	青海省湟中县鲁沙尔镇朱家庄	2015－07－30
羊永 1－3	甘肃省甘南藏族自治州合作市临潭县羊永乡	2013－07－21
15335－2	青海省同德县巴沟乡下阿格村	2015－07－14
16025	云南省昆明市双龙乡	2015－12－20
14-15-3-30	云南省玉溪红塔区大营街师旗	2014－03－13
15427	青海省湟中县鲁沙尔镇朱家庄	2015－07－30
15303－5	青海省湟源县日月藏族乡寺滩村	2015－07－13
15503－2	青海省民和县松树乡松树村	2015－06－18
15299－2	青海省互助土族自治县巴扎藏族乡	2015－07－12
16309－1	云南省大理白族自治州剑川县金华镇邑平村	2016－04－14
14-15-5-3	云南省大理白族自治州鹤庆县松桂镇松桂村委会衍庆村	2014－05－11
16271－1	云南省嵩明县白邑乡滇源镇南营村	2016－04－12
16294－3	云南省大理白族自治州剑川县金华镇邑平村	2016－04－14
15494	青海省循化县扎汗都斯乡阿河滩村	2015－06－15
15323－4	青海省共和县铁盖乡上合乐寺村	2015－07－13
15325－2	青海省共和县铁盖乡上合乐寺村	2015－07－13
15343－3	青海省同德县尕巴松多镇	2015－07－14
15332－1	青海省同德县巴沟乡卡力岗村	2015－07－14

供试小麦品种:苗期常规接种温度条件(10℃)下高感条锈病(侵染型 4 型,严重度 100%)的 20 个品种(表 2)。

表 2　供试高感条锈病小麦品种[1)]

Table 2　Highly susceptible wheat varieties to stripe rust

序号 Serial number	品种名称 Variety name	生态习性 Ecological habit	*Yr* 基因 *Yr* gene
1	水源 11	冬性	*YrSu*
2	丰产 3 号	冬性	*Yr*1,+
3	Chinese 166	冬性	*Yr*1
4	Jupiteco S	冬性	/
5	NJ119-4	冬性	*YrBMM*
6	Chinese Spring	春性	/
7	Avocet S	春性	/
8	辉县红	冬性	/
9	Thatcher	春性	/
10	Bobwhite	春性	/
11	扬麦 6 号	春性	—
12	CBO37	弱冬性	—
13	S110	冬性	/
14	Morocco	春性	/
15	Chancellor	春性	—
16	宁麦 15	弱冬性	—
17	Local Red	春性	/
18	扬麦 10	春性	—
19	扬麦 12	春性	—
20	扬麦 18	春性	—

1) "/"表示不含有已知抗条锈病基因;"—"表示未确定是否含有抗条锈病基因。
"/" indicates variety without known yellow rust resistance (*Yr*) genes; "—"indicates not determined.

病毒载体:*pCaBS-α*、*pCaBS-β*、*pCaBS-γ* 以及含有小麦 *TaPDS*(编码八氢番茄红素脱氢酶 phytoene desaturase)基因片段的重组病毒载体质粒由中国农业大学李大伟教授惠赠,含有小麦条锈菌 *Tublin*(*TUB*)基因片段的重组病毒载体质粒由本实验室构建。以上质粒均转入农杆菌 EHA105,于−80℃条件下长期保存备用。

供试植物材料:无毒本生烟以及供试小麦品种均由本实验室保存。

供试试剂及溶液:"花宝"营养液;石英砂;硅藻土;LB 培养基(蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,氯化钠 10 g,去离子水定容至 1 L 并调节 pH 值为 7.0,固体培养基按 15 g/L 添加琼脂粉);农杆菌悬浮液(每 100 mL 灭菌水加入 1 mL 1 mol/L MES,1 mL 1 mol/L $MgCl_2$,100 μL 150 mol/L MAS);硫酸卡那霉素(100 mg/mL);利福平素(25 mg/mL);磷酸缓冲液(20 mmol/L,pH 7.0)。

1.2　方法

1.2.1　小麦条锈菌扩繁与耐高温性评价

采用高感病品种'铭贤 169'扩繁 22 个耐高温条锈菌至产生足量的夏孢子,同一批次依次接种 20 个供试小麦材料。即将待鉴定的小麦材料播种于直径为 10 cm 的塑料花盆中,待出苗 9～10 d,选取第一片叶完全展开且长势一致的幼苗,采用扫抹法接种'铭贤 169'扩繁的菌株夏孢子。接种后的小麦材料于(21±0.3)℃黑暗保湿 24 h,然后转移至 13～16℃的温室(L∥D=16 h∥8 h,光照强度 8 000～12 000 lx)继续潜育培养约 16 d,调查发病严重度。根据高温条件下条锈菌在高感病品种'铭贤 169'上侵染严重度,将条锈菌耐高温性水平分为 0、1、2、3、4、5 共 6 级(表 3)[9]。

表 3　小麦条锈菌耐高温性水平分级鉴定

Table 3　Rating scales for high-temperature tolerance levels of wheat stripe rust pathogen

耐高温性级别 High-temperature tolerance level	症状描述 Symptom description
0 级	严重度 0,叶片上不产生夏孢子
1 级	1%≤严重度<10%,仅在叶尖产生很少量的夏孢子堆
2 级	10%≤严重度<20%,在叶尖附近形成较多的夏孢子堆
3 级	20%≤严重度<40%,在叶片中部及上部形成较多的夏孢子堆
4 级	40%≤严重度<60%,在叶片的中部及上部形成大量夏孢子堆
5 级	严重度≥60%,在叶片的中上部、甚至整个叶片形成大量夏孢子堆

1.2.2　BSMV 扩繁

1.2.2.1 本生烟的培育

将本生烟草 *Nicotiana benthamiana* 种子播种于草炭土与蛭石按照 3∶1混合的塑料盆中,待烟草长至两片叶完全展开,移栽至塑料穴盘。育苗间温度 22～25℃,湿度 70%,光照 4 100 lx 左右。期间每隔 10 d 补充一次"花宝"营养液,健康幼苗长至 8～10 叶期进行去顶,烟龄达 30 d 可用于病毒接种试验。

1.2.2.2　农杆菌接种健康烟草

将−80℃保存的农杆菌(分别含有 BSMV 的 α、

β、γ链，其中γ链携带小麦 *TaPDS* 基因片段）在 LB 固体培养基（含 10 mg/mL Kana 和 50 mg/mL Rif）上划线，28℃培养至有单菌落生成。用灭菌枪头挑选单菌落于 3 mL LB 液体培养基（含 10 mg/mL Kana 和 50 mg/mL Rif），28℃振荡培养过夜。将过夜培养的单菌落菌液转接至 50 mL LB 液体培养基（含 10 mg/mL Kana 和 50 mg/mL Rif）继续振荡培养过夜。4℃转速 4000 r/min 离心 10 min 收集农杆菌，利用农杆菌悬浮液调节菌液浓度至 $A_{600}=0.7$。将分别含有 BSMVα、β、γ链的土壤农杆菌悬浮液等体积混合，28℃黑暗静置 3 h 以上。用 1 mL 无菌注射器（去掉针头）注射 8～10 叶期健康的本生烟草叶片，利用健康烟草为过渡寄主扩繁病毒。每株烟草注射顶端幼嫩的 2～3 片叶，叶背打孔，全叶注射，黑暗过夜，置于光照周期 L∕∕D＝16 h∕∕8 h，光照强度 4 000～5 000 lx，温度 22～25℃，湿度 75％的光照培养箱培养。

1.2.2.3 BSMV 接种小麦

剪取注射后 5～7 d 的已经感染病毒的烟草叶片并称量重量。灭菌的研钵中加入 1∶1（*W*∶*V*）的 20 mmol/L 磷酸缓冲液（pH7.0），研磨烟草叶片成浆状并用无菌纱布过滤。收集滤液，滤液中加入 1％的石英砂与硅藻土。蘸取烟草汁液混合物，自下往上单向摩擦接种小麦。远距离喷水清洗接种小麦叶片，于 20℃恒温培养，光照周期 L∕∕D＝16 h∕∕8 h，湿度 70％。观察供试材料接种携带小麦 *TaPDS* cDNA 片段的 BSMV 后其症状表现，根据叶片产生的褪绿条纹以及漂白症状明确供试小麦品种对 BSMV 的亲和程度。BSMV 接种设置 2 次独立生物学重复，每次生物学重复包括 2 个技术重复。

1.2.3 干涉 *TUB* 基因后小麦条锈菌耐高温性分析

当健康的本生烟草长至 30 d，分别注射 BSMV：00（含有 BSMV 的 α、β、γ链，其中γ链不携带任何外源片段）农杆菌悬浮液与 BSMV：*TUB* 农杆菌悬浮液（含有 BSMV 的 α、β、γ链，其中γ链携带小麦条锈菌 *TUB* 基因片段）扩繁病毒，5～7 d 提取烟草汁液，接种 2 叶期小麦‘Local Red’。接种病毒 7 d 即可对小麦材料的病毒接种叶进行 RNA 提取验证是否已经感染病毒。接种病毒 10～12 d 后对确定已感染 BSMV：00 与 BSMV：*TUB* 的小麦幼苗接种耐高温条锈菌株 15323-4，同时接种未感染病毒的‘Local Red’幼苗为空白对照。小麦幼苗接种条锈菌后在高温条件下（21±0.3）℃黑暗保湿 24 h，转移至 13～16℃的温室（L∕∕D＝16 h∕∕8 h，光照强度 8 000～12 000 lx）继续潜育培养，约 16 d 观察发病严重度以及夏孢子堆密度情况。

2 结果与分析

2.1 小麦品种在高温条件下接种条锈菌的严重度鉴定

本研究在高温（21±0.3）℃条件下接种条锈菌，保湿 24 h 后继续在 13～16℃低温温室潜育培养约 16 d，调查不同菌株接种供试小麦品种后小麦的发病严重度，确定各菌株的耐高温性水平，同时确定小麦品种的感病程度（表 4）。经过分析比较，有 11 个小麦品种即‘NJ119-4’、‘Chinese Spring’、‘辉县红’、‘Thatcher’、‘S110’、‘Morocco’、‘Chancellor’、‘宁麦 15’、‘Local Red’、‘扬麦 12’与‘扬麦 18’在高温条件下接种小麦条锈菌菌株后发病严重度较高，每个品种至少对 4 个耐高温条锈菌的严重度达到 3～4 级。同时发现，耐高温菌株 15335-2、14－15-3-30、15323-4、14011-1 与 15463 耐高温性水平较高，在高温接种条件下每个菌株至少引起 7 个供试品种发病严重度达到 3～4 级。其中，耐高温菌株 15335-2 在小麦品种‘辉县红’、‘Thatcher’、‘CBO37’、‘S110’、‘Morocco’、‘Chancellor’、‘宁麦 15’、‘Local Red’、‘扬麦 10 号’、‘扬麦 12 号’以及‘扬麦 18 号’上；15323-4 在‘水源 11’、‘丰产 3 号’、‘NJ119-4’、‘Chinese Spring’、‘Morocco’、‘Chancellor’、‘Local Red’、‘扬麦 10 号’上；14－15-3-30 在‘NJ119-4’、‘Chinese Spring’、‘辉县红’、‘Thatcher’、‘扬麦 6 号’、‘CBO37’、‘S110’、‘扬麦 12’、‘扬麦 18’上的发病严重度达到 3～4 级。

2.2 小麦品种对 BSMV 亲和程度分析

取初步筛选获得的 11 个小麦品种接种携带小麦 *PDS* 基因的 BSMV：*TaPDS*，鉴定其对 BSMV 亲和性。接种重组病毒载体 14 d 左右部分小麦材料开始出现漂白褪绿症状，接种 20 d 左右小麦叶片漂白褪绿症状明显，统计出每个品种显症植株占总株数的百分比（表 5）。根据统计结果，小麦品种‘NJ119-4’、‘Chinese Spring’、‘宁麦 15’、‘Local Red’、‘扬麦 12’以及‘扬麦 18’对 BSMV 亲和程度适合试验要求，当 *TaPDS* 基因被干涉后症状明显（图 1）。

表 4　小麦品种接种耐高温条锈菌菌株后的严重度

Table 4　Severity of wheat varieties inoculated with stripe rust isolates with high-temperature tolerance

菌株 Isolate	小麦品种 Wheat variety																			
	水源11	丰产3号	Chinese 166	Jupiteco S	NJ119-4	Chinese Spring	Avocet S	辉县红	Thatcher	Bobwhite	扬麦6号	CBO37	S110	Morocco	Chancellor	宁麦15	Local Red	扬麦10	扬麦12	扬麦18
15463	0	2	0	0	2	1	0	0	4	0	0	3	3	3	3	3	4	0	0	0
P4-3-6	1	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	4	0	0	0
14006-3	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	3	0	0	4	0	4	0
14011-1	0	0	0	0	1	2	2	3	0	0	0	0	4	4	3	3	4	0	4	4
15454-1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4	2	2	4	2	2	1
羊永 1-3	3	1	0	0	2	3	0	2	2	0	0	1	1	0	0	1	3	0	1	1
15335-2	0	0	0	0	0	1	0	3	3	0	0	3	3	3	3	3	4	3	3	3
16025	0	0	0	0	1	2	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	4	2	0	4
14-15-3-30	0	2	0	0	3	4	0	3	4	0	3	4	4	2	0	2	0	2	3	4
15427	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	3	4	4	4	2	0	0
15303-5	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	4	0	0	2	1	1	1
15503-2	0	0	0	0	3	3	0	3	0	0	0	0	2	3	0	0	3	0	1	3
15299-2	0	0	0	0	0	2	0	1	3	0	0	1	1	3	0	2	3	1	1	1
16309-1	0	0	0	0	3	0	0	4	4	0	0	1	4	3	0	0	4	2	0	0
14-15-5-3	0	0	0	0	3	0	4	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0
16271-1	0	0	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	2	0	1	0	2	3	0	0
16294-3	0	0	0	0	3	0	1	1	2	0	0	0	4	3	0	1	3	0	1	0
15494	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	2	3	4	3	1	0
15323-4	4	3	0	0	4	3	0	1	1	0	0	1	2	4	4	0	4	3	0	2
15325-2	1	1	0	0	1	0	0	1	3	0	1	1	3	2	2	1	4	2	3	3
15343-3	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	0	3	3	3	2	3	0	0	1
15332-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	4	0

表 5　小麦品种对 BSMV 的亲和性[1)]

Table 5　Compatibility of wheat cultivars with *Barley stripe mosaic virus*

品种 Variety	漂白褪绿症状植株比例/%[a] Ratio of plants with photobleaching leaves			
	重复 1-1[b]	重复 1-2	重复 2-1	重复 2-2
NJ119-4	22(2/9)[c]	17(1/6)	43(3/7)	0
Chinese Spring	22(2/9)	0	20(1/5)	0
辉县红	0	0	/[d]	/
Thatcher	0	0	0	0
S110	17(1/6)	0	/	/
Morroco	0	17(1/6)	0	0
Chancellor	25(2/8)	0	/	/
宁麦 15	14(1/7)	17(1/6)	14(1/7)	0
Local Red	25(2/8)	25(2/8)	17(1/6)	0
扬麦 12	0	17(1/6)	33(2/6)	83(5/6)
扬麦 18	0	33(3/9)	86(6/7)	100(8/8)

1) a：漂白褪绿症状植株比例＝显症株数/总株数×100%；b：重复 1-1，1-2 和重复 2-1，2-2 分别表示第 1 次和第 2 次生物学重复的 2 次技术重复；c：括号数字“2/9”表示“显症株数/测试总株数”，其他数据意义相同；d：“/”表示数据缺失。

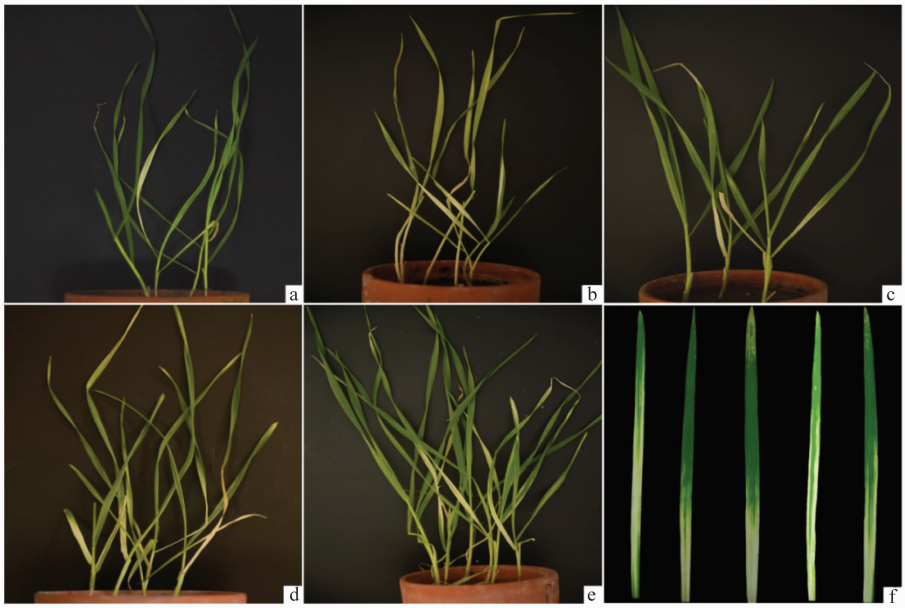
a：Ratio of plants with photobleaching leaves＝plants with photobleaching leaves / total plants×100%；b：Replicate 1-1，1-2 and replicate 2-1，2-2 represent two repetitional technical experiments including a first and a second biological replicates；c：2/9 in bracket indicates：2 plants with photobleaching leaves/9 total plants tested. Data in the other brackets follow the same rule；d：/ indicates no data available.

结合供试品种在高温条件下接种小麦条锈菌菌株后发病严重度以及接种 BSMV 病毒后 *TaPDS* 基因的沉默效果，确定小麦品种‘Local Red’与 15335-2、15323-4 等 18 个菌株；‘NJ119-4’与 14-15-3-30、15323-4 等 7 个菌株，‘扬麦 12’与 15335-2、14-15-3-30 等 6 个菌株；‘扬麦 18’与 15335-2、14-15-3-30 等 6 个菌株，‘Chinese Spring’与 14-15-3-30、15323-4 等 5 个菌株，‘宁麦 15’与 15335-2 等 4 个菌株组成亲和(侵染型 4 型，严重度 3～4 级)互作组合(表 6)，可以用来进行条锈菌耐高温相关基因功能研究。特别是‘Local Red’对供试的 15335-2、15323-4 等 18 个耐高温菌株表现为高度亲和，在高温条件下接种这些菌株后其发病严重度达到 3 级以上，并且与 BSMV 病毒亲和度较高，是利用 HIGS 方法验证条锈菌耐高温相关基因功能的理想材料。

2.3　利用 HIGS 技术干涉小麦条锈菌耐高温菌株 *TUB* 基因

以小麦品种‘Local Red’与耐高温菌株 15323-4 组成互作组合，分析高温接种条件下干涉耐高温条锈菌菌株中 *TUB* 基因对条锈菌侵染发病的影响。

与未接种病毒的空白对照 Mock 相比，感染携带空载体 BSMV:00 病毒的小麦幼苗叶片上的条锈菌侵染略受影响，发病严重度与孢子密度有所降低。进一步对比发现，当条锈菌 *TUB* 基因被干涉后，接种叶片发病严重度进一步降低，孢子堆数量更少，且夏孢子堆周围组织出现少量褪绿。说明当 *TUB* 基因被干涉后，高温条件下条锈菌的侵染过程明显受到了抑制(图 3)。



a: 'Chinese Spring'; b: 'Local Red'; c: 'NJ119-4'; d: '扬麦12'; e: '扬麦18'; f: 上述对应小麦品种叶片漂白褪绿症状(从左至右)
a: 'Chinese Spring'; b: 'Local Red'; c: 'NJ119-4'; d: 'Yangmai 12'; e: 'Yangmai18'; f: Single photobleaching leaf of corresponding wheat varieties mentioned above (from left to right)

图 1　小麦品种 *PDS* 基因被干涉后漂白褪绿症状

Fig. 1　Photobleaching of wheat cultivars with *PDS* gene silenced

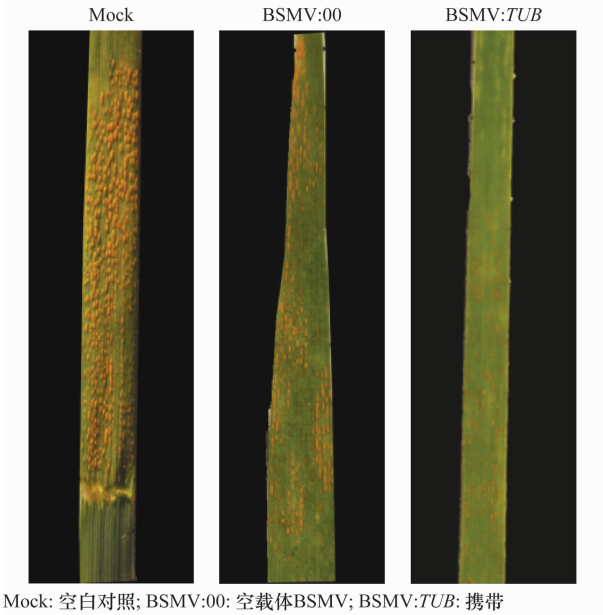
表 6　适合利用 HIGS 方法验证小麦条锈菌耐高温相关基因功能分析的互作体系

Table 6　Suitable interactive combinations between wheat varieties and *Pst* isolates for analyzing high-temperature tolerance-related gene functions using HIGS

品种 Variety	菌株 Isolate						
Local Red	15335－2	15323－4	14011－1	15463	15503－2	16309－1	15343－3
	P4－3－6	16294－3	15427	14006－3	15325－2	15494	15299－2
	羊永 1－3	15332－1	15454－1	16025			
NJ119－4	14-15-3-30	15323－4	15503－2	16309－1	P4－3－6	16294－3	14-15-5-3
扬麦 12	15335－2	14-15-3-30	14011－1	14006－3	15325－2	15332－1	
扬麦 18	15335－2	14-15-3-30	14011－1	15503－2	15325－2	16025	
Chinese Spring	14-15-3-30	15323－4	15343－3	15503－2	羊永 1－3		
宁麦 15	15335－2	14011－1	15463	15427			

3　讨论

研究表明，多数小麦品种具有不同程度的温敏微效基因调控的抗条锈性[10]，构建研究条锈菌耐高温相关基因功能的互作体系需要排除温敏微效抗性对试验结果的干扰。本研究首先筛选了 20 个常温条件下高感条锈病的小麦品种，研究了其与 22 个耐高温菌株的互作，发现其中'Local Red'、'NJ119-4'、'扬麦 12'、'扬麦 18'、'Chinese Spring'以及'宁麦 15'等 11 个品种在高温接种条件下呈现高严重度的侵染表型，结合接种 BSMV:*TaPDS* 后的显症情况，筛选出适合利用 HIGS 方法研究条锈菌耐高温相关基因功能的小麦品种'Local Red'与菌株 15335-2 和 15323-4 等互作组合。同时获得了 15335-2、14-15-3-30 和 15323-4 等一批耐高温性稳定且对上述品种具有高致病性的条锈菌菌株，为开展后续试验奠定了基础，也可为其他专性寄生真菌的相关试验提供参考。



Mock: 空白对照; BSMV:00: 空载体BSMV; BSMV:*TUB*: 携带*TUB*基因cDNA的BSMV重组载体
Mock: Control; BSMV:00: BSMV with a vector control; BSMV:*TUB*: BSMV with a vector inserted with a cDNA fragment of the gene *TUB*

图 2　利用 HIGS 技术干涉小麦条锈菌 *TUB* 基因对耐高温菌株在'Local Red'的侵染影响

Fig. 2　Effects of *Pst* gene *TUB* silence on infection development of high-temperature tolerant stripe rust isolate on 'Local Red' using HIGS

高温条件下,接种空载体病毒的小麦植株与空白对照组相比条锈菌发病减弱,而实际常规接种温度下,两组材料发病没有明显差异。根据已有文献报道,BSMV 病毒中 3 种 RNA 链即 α、β、γ 的比例会因为温度条件的不同而发生显著变化,致使感病植物中病毒含量改变[11]。推测一定范围内温度升高有利于病毒繁殖,影响了条锈菌的发病,致使高温条件下接种了空载体的试验组发病减弱。

试验发现,为提高小麦接种病毒的效率,扩繁病毒应使用 8～10 叶期的幼嫩烟草,烟龄过大则烟草内病毒繁殖量会大大降低。此外,烟草病毒汁液中保证有适量硅藻土或石英砂可以提高病毒接种效率,但摩擦剂的量过大可能使小麦幼苗受伤过重导致死亡。在病毒摩擦接种小麦的过程中,一只手固定小麦茎部,一只手轻柔地单向摩擦接种,可避免小麦根部被松动或者对叶片造成太大的机械伤害。

已有报道表明小麦品种'Morocco'与'Thatcher'均有易于观察到利用 BSMV 沉默目的基因的表型,可作为基因沉默的试验材料。但在研究中发现,'Morocco'接种病毒的成功比例较低且显症时间明显晚于其他小麦材料。两次重复试验中均没能观察到'Thatcher'叶片接种 BSMV:*TaPDS* 后产生漂白褪绿症状,但能检测到植株中的病毒 RNA。因此,BSMV 病毒载体对小麦品种'Local Red'基因沉默效率高于'Morocco'与'Thatcher',更适合作为研究条锈菌耐高温相关基因功能的寄主材料。

参考文献

[1] 陈万权,徐世昌,吴立人. 中国小麦条锈病流行体系与持续治理研究回顾与展望[J]. 中国农业科学,2007,40(S1): 3107－3113.

[2] CHEN Wanquan, WELLINGS C, CHEN Xianming, et al. Wheat stripe (yellow) rust caused by *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* [J]. Molecular Plant Pathology, 2014, 15(5): 433－446.

[3] 陈万权,康振生,马占鸿,等. 中国小麦条锈病综合治理理论与实践[J]. 中国农业科学,2013,46(20): 4254－4262.

[4] MILUS E A, KRISTENSEN K, HOVMØLLER M S. Evidence for increased aggressiveness in a recent widespread strain of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* causing stripe rust of wheat [J]. Phytopathology, 2009, 99(1): 89－94.

[5] HOVMØLLER M S, YAHYAOUI A H, MILUS E A, et al. Rapid global spread of two aggressive strains of a wheat rust fungus [J]. Molecular Ecology, 2008, 17(17): 3818－3826.

[6] YIN Chuntao, JURGENSON J E, HULBERT S H. Development of a host-induced RNAi system in the wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* [J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 2011, 24(5): 554－561.

[7] GODGE M R, PURKAYASTHA A, DASGUPTA I, et al. Virus-induced gene silencing for functional analysis of selected genes [J]. Plant Cell Reports, 2008, 27(2): 209－219.

[8] HOLZBERG S, BROSIO P, GROSS C, et al. Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant [J]. Plant Journal, 2002, 30(3): 315－327.

[9] 商鸿生,任文礼,王素梅. 小麦条锈病严重度分级标准图的探讨[J]. 植物保护, 1990,16(1): 31.

[10] 万安民,牛永春,吴立人. 小麦苗期抗条锈温敏微效基因的初步鉴定[C]// 中国植物保护学会青年工作委员会. 植物保护 21 世纪展望—植物保护 21 世纪展望暨第三届全国青年植物保护科技工作者学术研讨会文集. 北京:中国科学技术出版社, 1998:253－255.

[11] 彭学贤,曲士绵. 大麦条纹花叶病毒研究进展[J]. 病毒学杂志,1989(4): 329－335.

(责任编辑: 田　喆)